

Mémoire de Maîtrise en médecine No 224

L'implication des cellules de type cellules souches cancéreuses dans la résistance aux drogues du neuroblastome

Etudiant

Nadja Chevalier

Tuteur

Dr. Nicole Gross

Laboratoire d'Oncologie Pédiatrique, CHUV

Co-tuteur

Dr. Aurélie Coulon

Laboratoire d'Oncologie Pédiatrique, CHUV

Expert

Dr. Nicolas Von der Weid

Dpt de Pédiatrie, CHUV

Lausanne, décembre 2011

TABLE DES MATIERES

RESUME	4
ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION	6
Le neuroblastome.....	6
Aspects biologiques.....	6
Aspects cliniques.....	6
Les chimiothérapies prescrites pour le traitement les NBs de haut risque.....	8
Les cellules souches cancéreuses.....	8
Auto-renouvellement.....	9
Potentiel de prolifération indéfini.....	9
Pluripotence.....	10
Résistance aux drogues.....	10
Les CSCs dans le NB.....	10
L'hétérogénéité des NBs est compatible avec le modèle des CSC.....	10
MDR1 dans le NB.....	11
But du projet.....	11
MATERIELS ET METHODES	12
Lignées, milieux et culture cellulaire.....	12
Culture de sphères.....	13
Tests de viabilité cellulaire et réponse aux drogues.....	13
Tests clonogéniques en soft agar.....	14
Préparation cellulaire pour la cytométrie en flux (FACS).....	14
Analyses statistiques.....	14

RESULTATS	15
Le profil de réponse aux agents cytotoxiques est propre à chaque lignée.....	15
L'effet du type cellulaire sur le profil de réponse aux drogues.....	16
L'effet du milieu de culture sur le profil de réponse aux drogues.....	17
Les cellules traitées ne possèdent pas une capacité d'auto-renouvellement supérieure aux cellules contrôles.....	18
Les cellules traitées possèdent des propriétés moindres de clonogénicité par rapport aux cellules contrôles.....	20
NB1.....	20
LAN-1/SK-N-Be(2)c.....	21
Les sphères dérivant des cellules de la lignée SK-N-Be(2)c traitées ont acquis un caractère résistant aux diverses chimiothérapies.....	21
L'expression de MDR1 ne varie pas entre la population contrôle et la population traitée.....	23
NB1.....	23
LAN-1/SK-N-B2(2)c.....	23
DISCUSSION	24
Les différents profils de résistance aux drogues reflètent l'hétérogénéité des lignées de NBs et dépendent des milieux de culture cellulaire.....	24
Les cellules du NB possèdent des caractéristiques s'apparentant aux CSC.....	24
Le LD 80 a sélectionné deux populations cellulaires distinctes.....	25
Un enrichissement en CSCs n'a pas été mis en évidence dans la population traitée par rapport à la population contrôle.....	26
La complexité des mécanismes de résistance aux drogues du NB serait-elle le reflet de l'hétérogénéité cellulaire ?.....	26
PERSPECTIVES	28
BIBLIOGRAPHIE	29

RESUME

Le neuroblastome (NB), tumeur spécifique de l'enfant, se situe au second rang en terme de fréquence des tumeurs solides dans la population pédiatrique (1). Il dérive des cellules primitives de la crête neurale, une population de cellules embryonnaires dotées d'une capacité de différenciation en une panoplie de tissus très variés, dont le système nerveux sympathique (2). Cette origine explique la très grande hétérogénéité du NB, tant du point de vue biologique que clinique (3). Malgré un traitement intensif et multimodal (chirurgie, chimiothérapie à haute dose, greffe de moelle osseuse et immunothérapie), seuls 30 % des patients de haut risque (stade IV) survivent sans rechute. La forte résistance du neuroblastome de haut grade aux diverses thérapies est une des causes probable du pronostic sombre de cette tumeur. Les thérapies actuelles étant insuffisamment efficaces, il est primordial de comprendre les mécanismes impliqués dans le processus de résistance afin d'élaborer de nouveaux traitements, mieux ciblés, capables de contrer toute résistance (4).

Il a été démontré que certains cancers, tels que les tumeurs du poumon, du sein, de la prostate ou du colon, possédaient des cellules souches cancéreuses (CSCs) (5). Ces dernières, définies comme étant une petite sous-population de cellules malignes, jouent un rôle prépondérant dans l'initiation et la progression tumorale. Elles partagent certaines propriétés avec les cellules souches physiologiques, telles que la capacité d'auto-renouvellement, un potentiel de prolifération indéfini, une dépendance à un microenvironnement spécifique, une faculté de pluripotence et une résistance accrue aux drogues (6). Ce modèle de CSCs a également été étudié pour le NB (7), permettant ainsi d'avancer l'hypothèse selon laquelle cette population de CSCs serait responsable de la résistance aux chimiothérapies des cellules tumorales du NB.

Afin de tenter d'éclaircir le caractère résistant aux drogues des CSCs du NB, nous avons sélectionné des sous-populations cellulaires résistantes, en traitant par divers agents cytotoxiques (cisplatine, doxorubicine, rapamycine et vincristine) cinq lignées différentes de neuroblastes. Dans le but d'établir un potentiel enrichissement en CSCs au sein de ces sous-populations par rapport aux populations contrôles non traitées, nous avons testé leurs fonctions d'auto-renouvellement et de clonogénicité. Ces propriétés ont été respectivement mises en évidence par la capacité des cellules à former des sphères de plusieurs générations dans des conditions de culture inhibant l'adhésion cellulaire et par la mesure de la croissance cellulaire en milieu semi-solide (soft agar assay). Une analyse d'expression génique effectuée préalablement par microarray (Human Genome U133Plus 2.0 Affymetrix GeneChip oligonucleotide) dans le laboratoire avait révélé une liste de gènes surexprimés dans les CSCs, dont fait partie *mdr1* (8). Ce gène code la protéine de transport Pgp (P-glycoprotéine), impliquée dans le mécanisme de résistance (9,10). Une étude par cytométrie en flux de l'expression de MDR1 dans nos diverses populations a également été réalisée afin de mettre en évidence une potentielle surexpression de ce gène au sein des cellules résistantes aux chimiothérapies.

Mots-clés : neuroblastome, cellules souches cancéreuses, résistance aux drogues.

ABREVIATIONS

ATP:	adenosine-5'-triphosphate
bFGF:	basic fibroblast growth factor
BSA:	bovine serum albumin
CSC:	cellule souche cancéreuse
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA:	ethylene-diamine-tetra-acetic acid
EGF:	epidermal growth factor
FACS:	fluorescence activated cell sorting
IGF:	insulin growth factor
LD:	lethal dose
MDR1:	multidrug resistance gene 1
MTS/PMS:	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)/phenazine methosulfate
NB:	neuroblastome
NBM:	neural basic medium
NCSC:	neural crest stem cell
NGF:	Neural Growth Factor
PBS:	phosphate buffer solution
PGP:	P-glycoprotein
SVF:	serum de veau foetal

INTRODUCTION

Le neuroblastome

Le neuroblastome (NB), tumeur spécifique de l'enfant, se situe au second rang en terme de fréquence des tumeurs solides dans la population pédiatrique (1). Il représente la première cause de décès due à une tumeur solide chez l'enfant et se distingue par une grande hétérogénéité autant du point de vue biologique que clinique.

Aspects biologiques

Le NB est une tumeur embryonnaire qui dérive des cellules primitives de la crête neurale. Lors du développement embryonnaire, les cellules souches de la crête neurale acquièrent la propriété de migrer vers un site prédéfini où elles sont capables de se différencier en un grand nombre de types cellulaires différents. Elles constituent les cellules progénitrices de nombreux tissus du corps humain dont le système nerveux sympathique (2). Cette origine explique la très grande hétérogénéité biologique du NB (3).

Le NB fait partie des tumeurs histologiquement indifférenciées, nommées tumeurs à petites cellules rondes basophiles, caractérisées par des amas de cellules de petite taille avec un noyau arrondi. Les lymphomes, le rhabdomyosarcome, le sarcome d'Ewing et la tumeur de Wilms, qui appartiennent également au groupe des tumeurs à petites cellules rondes basophiles, constituent le diagnostic différentiel du NB. Toutefois, chaque type tumoral possède un aspect histologique caractéristique, permettant l'exclusion des autres diagnostics dans la plupart des cas (1).

De nombreuses altérations génétiques ont été mises en évidence pour le NB. La plupart de ces aberrations chromosomiques ou moléculaires sont utilisées comme outils pronostic. Parmi les facteurs de bon pronostic se trouvent une hyperdiploïdie et une forte expression du gène Trk A qui est un récepteur de haute affinité pour le facteur de croissance nerveuse NGF (Neural Growth Factor). Des translocations chromosomiques déséquilibrées, telles qu'une délétion sur la partie distale du bras court du chromosome 1, du bras long du chromosome 11 ou un gain sur le bras long du chromosome 17, ainsi que l'amplification de l'oncogène MYCN sont associées à un pronostic défavorable (3).

Aspects cliniques

La tumeur primaire est le plus souvent localisée au niveau abdominal dans la médulla surrénalienne. Toutefois, elle peut se loger partout sur le trajet de la chaîne du système nerveux sympathique, allant du cou jusqu'au pelvis (11). Le site anatomique de la masse tumorale pouvant être très variable, la symptomatologie du NB est riche et diversifiée. De plus, la clinique varie en fonction de l'âge de l'enfant. Dans la période infantile (jusqu'à deux ans), les manifestations cliniques caractéristiques du NB sont une masse volumineuse abdominale et de la fièvre accompagnés parfois d'une perte de poids. Une compression de la moelle osseuse peut survenir lorsque la masse tumorale se situe au niveau paravertébral. Chez un enfant plus âgé (>2 ans), la tumeur primaire demeure souvent asymptomatique.

Elle sera alors mise en évidence par la présence de métastases symptomatiques pouvant se manifester par des douleurs osseuses ou gastro-intestinales, des signes respiratoires, une aplasie médullaire ou une exophtalmie accompagnée d'une ecchymose peri-orbitaire (syndrome de Hutchinson) (1).

Le diagnostic est posé devant un tableau clinique évocateur, une imagerie caractéristique et un taux élevé de catécholamines urinaires (acide homo-vanillylique et acide vanilylmandélique). La biopsie de la tumeur primaire représente une étape importante, qui permet la confirmation du diagnostic et la réalisation d'analyses génétiques déterminantes pour le pronostic. Une ponction de moelle osseuse, une scintigraphie au MIBG (Meta-Iodo-Benzyl-Guanidine) et une scintigraphie osseuse sont effectuées lors de la recherche de métastases (11).

L'évolution clinique est extrêmement variable et dépend de plusieurs critères dont l'âge du patient au diagnostic (si <1 an le pronostic est favorable), le stade tumoral selon l'INSS (International Neuroblastoma Staging System) (figure 1) et les altérations génétiques.

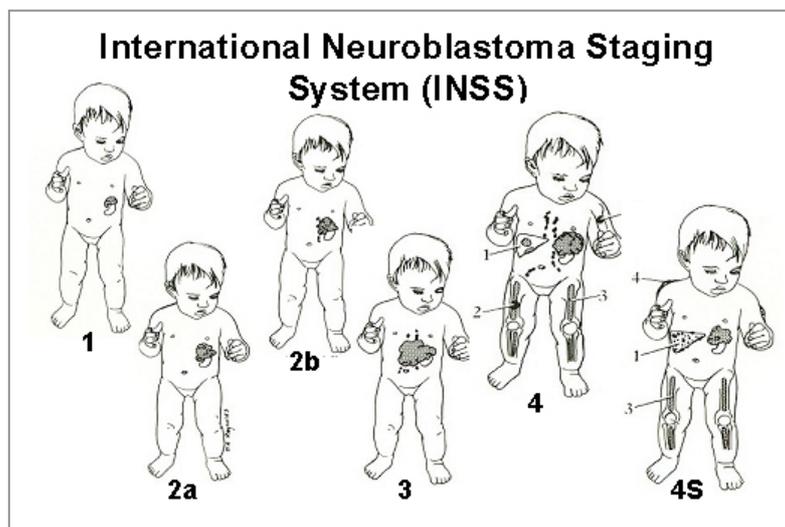


Figure 1: International Neuroblastoma Staging System (INSS)

Stade 1: Tumeur localisée avec excision complète, avec ou sans maladie résiduelle microscopique ; ganglions ipsilatéraux exempts de tissu tumoral microscopique (les ganglions attachés à la tumeur pouvant être positifs).

Stade 2A : Tumeur localisée avec excision incomplète ; ganglions lymphatiques ipsilatéraux non adhérents à la tumeur négatifs.

Stade 2B : Tumeur localisée avec ou sans excision complète, avec ganglions lymphatiques ipsilatéraux non adhérents positifs pour la tumeur, les ganglions controlatéraux devant être microscopiquement négatifs.

Stade 3 : Tumeur unilatérale non résecable infiltrant la ligne médiane, avec ou sans atteinte ganglionnaire régionale ; ou tumeur unilatérale localisée avec une atteinte ganglionnaire régionale controlatérale; ou tumeur de la ligne médiane avec extension bilatérale par atteinte ganglionnaire ou par infiltration.

Stade 4 : Toute tumeur primaire avec dissémination tumorale aux ganglions lymphatiques, à l'os, à la moelle osseuse, au foie, à la peau et/ou à d'autres organes (excepté les tumeurs entrant dans la définition du stade 4S).

Stade 4S : Tumeur primaire localisée (telle que définie pour les stades 1, 2A ou 2B), avec dissémination tumorale limitée à la peau, au foie et/ou à la moelle osseuse chez un enfant de moins d'un an.

La démarche thérapeutique est basée sur la stratification du risque. Récemment, un nouveau système portant le nom d'International Neuroblastoma Risk Group (INRG) a été élaboré, afin d'avoir une prise en charge internationale uniforme. Quatre catégories, très bas risque, bas risque, risque intermédiaire et haut risque (ou L1, L2, M, MS), ont été définies en fonction de l'âge au diagnostic, du stade tumoral, des caractéristiques histologiques, du grade de différenciation, de la ploïdie de l'ADN et de l'amplification de MYCN (12,13).

Une régression spontanée peut apparaître en l'absence de tout traitement chez de jeunes enfants (< 1 an) atteints d'un NB de stade 4S. Les patients de bas risque, qui présentent une tumeur primaire localisée sans métastase, sont traités par une exérèse chirurgicale seule. Cependant, la majorité des patients souffrent d'une maladie avancée (risque intermédiaire et haut risque), pour laquelle la chimiothérapie possède un rôle central dans le processus thérapeutique. Les enfants ayant une bonne réponse initiale au traitement d'induction bénéficient d'un protocole de consolidation, consistant en l'adjonction de hautes doses de chimiothérapies avec support de cellules souches hématopoïétiques.

Les chimiothérapies prescrites pour le traitement des NBs de haut risque

Les principales molécules utilisées sont la cisplatine et l'étoposide en alternance avec la vincristine, la doxorubicine et la cyclophosphamide (3). Chaque drogue possédant un mécanisme d'action différent pour tuer les cellules tumorales, leur synergie offre un meilleur résultat.

En effet, la cisplatine inhibe la synthèse d'ADN, la vincristine et la cyclophosphamide ont une action sur le cycle cellulaire en bloquant la division cellulaire, alors que la doxorubicine et l'étoposide agissent sur la topoisomérase II, induisant une fragmentation de l'ADN et la mort cellulaire par apoptose.

Le NB est une tumeur très chimio-sensible lors du premier contact avec les cytotoxiques. Malheureusement, il perd cette caractéristique au cours du traitement en développant de multiples mécanismes de résistance aux drogues. Ceci explique pourquoi, malgré un traitement intensif et multimodal (chirurgie, chimiothérapie à haute dose, greffe de moelle osseuse et immunothérapie), seuls 30 % des patients de haut risque (stade IV) survivent sans rechute (14). Les thérapies actuelles étant insuffisamment efficaces, il est primordial de comprendre les mécanismes impliqués dans le processus de résistance afin d'élaborer de nouveaux traitements, mieux ciblés, capables de contourner toute résistance (4).

Les cellules souches cancéreuses

Il a été démontré que certains cancers, tels que les tumeurs du poumon, du sein, de la prostate ou du colon, possédaient des cellules souches cancéreuses (CSCs) (5). Ces dernières, définies comme étant une petite sous-population distincte de cellules malignes, jouent un rôle prépondérant dans l'initiation et la progression tumorale. Elles détiennent certaines propriétés des cellules souches physiologiques, telles que la capacité d'auto-renouvellement, un potentiel de prolifération indéfini, une faculté de pluripotence, une résistance accrue aux drogues et une dépendance à un microenvironnement spécifique (figure 2) (6). Tout comme pour les cellules souches non tumorales qui possèdent un

microenvironnement spécifique, les CSCs communiquent avec un microenvironnement tumoral hétérogène et très complexe.

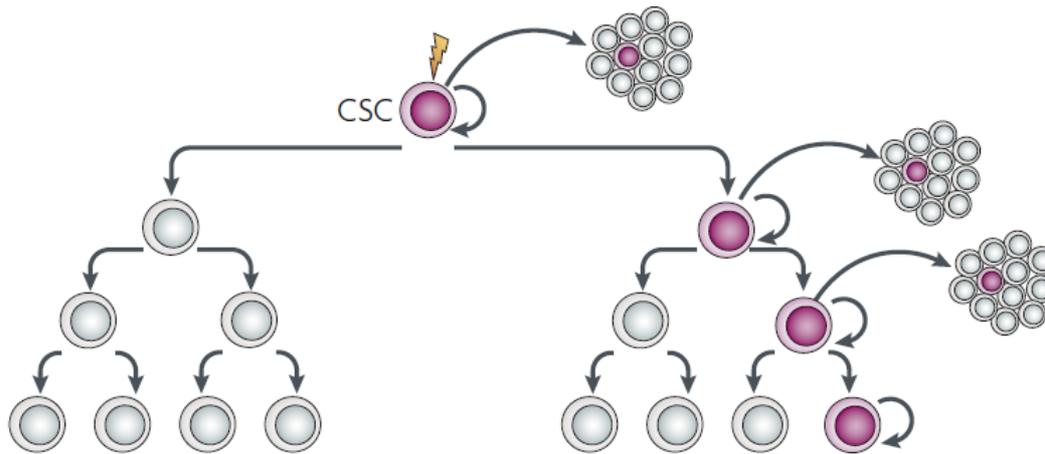


Figure 2: Le modèle des CSCs

Les CSCs, jouant un rôle prépondérant dans l'initiation et la progression tumorale, détiennent certaines propriétés des cellules souches physiologiques, telles que la capacité d'auto-renouvellement, un potentiel de prolifération indéfini et une faculté de pluripotence. Le schéma montre la transformation en CSC (en violet) par un « hit » représenté par l'éclair. Lors de son auto-renouvellement la CSC effectue des divisions asymétriques, sources de l'hétérogénéité cellulaire dans la tumeur.

J E Visvader, G J Lindeman Nat rev Cancer 2008.

Auto-renouvellement

Lors de la mitose, les CSCs sont capables d'effectuer une division asymétrique (figure 2). Une CSC donne naissance à une CSC fille identique, ainsi qu'à une autre cellule tumorale plus différenciée et engagée dans le processus de tumorigénèse. La CSC fille possède une capacité d'auto-renouvellement similaire à la cellule mère, permettant ainsi la perpétuation de la sous-population de CSCs (5,7).

Le modèle de culture de cellules en suspension non adhérente sous forme de sphères dans un milieu spécifique (NCSC) a été validé par plusieurs laboratoires comme étant un modèle de référence pour l'étude des cellules souches de la crête neurale et des CSCs. Ces conditions permissives pour la prolifération et la survie des cellules souches permettent l'évaluation de leur capacité à s'auto-renouveler (15). Il en résulte un enrichissement en CSCs d'une population tumorale lorsque celle-ci est cultivée *in vitro* sous forme de sphères. Par conséquent, ce modèle de culture fournit un support utile pour tester la réponse aux drogues des cellules de NBs potentiellement enrichies en CSCs (16).

Potentiel de prolifération indéfini

Une activité élevée des télomérases est retrouvée dans les CSC (17). La télomérase est une reverse transcriptase essentielle pour la réplication des télomères, qui constituent l'extrémité non codante des chromosomes. Ils sont nécessaires pour maintenir une stabilité chromosomique ainsi qu'un potentiel de prolifération indéfini. A l'inverse, le raccourcissement des télomères par une activité des télomérases insuffisante induit l'apoptose cellulaire (18).

Pluripotence

La faculté des CSCs à se différencier en divers types cellulaires peut être mise en évidence par la présence de cellules à des degrés de différenciation variables au sein d'une même tumeur. Cette hétérogénéité cellulaire correspond à la génération de différents progéniteurs par les CSCs (19).

Résistance aux drogues

Différents mécanismes de résistance aux drogues sont utilisés par la cellule tumorale : parmi eux, la mutation de la cible spécifique d'une drogue, l'inactivation de la drogue ou encore l'expulsion de celle-ci hors de la cellule (20).

Outre les caractéristiques décrites ci-dessus, les CSCs possèdent d'autres propriétés expliquant leur résistance accrue aux drogues, telles que la faculté à se mettre en quiescence, la capacité de réparation de l'ADN endommagé et une forte expression des transporteurs ATP-binding cassette (ABC) (10). Ces protéines transmembranaires, dont font partie ABCB1 (MDR1) et ABCC1 (MRP1), ABCG2 (« Side Population »), ont un rôle physiologique de transport unidirectionnel de substances à la fois hydrophobes et hydrophiles hors de la cellule par l'hydrolyse de l'ATP (adénosine-5'-triphosphate). Leur taux d'expression augmenté au sein des CSCs, induit l'efflux des chimiothérapies dans le milieu extracellulaire, entravant toute activité cytotoxique.

L'échec fréquent des traitements anti-tumoraux conventionnels pourrait être expliqué par l'acquisition d'une résistance aux chimiothérapies et à la radiothérapie par les CSCs. Il s'avère ainsi essentiel d'élaborer des traitements ciblant cette sous-population cellulaire afin d'éviter les rechutes tumorales. L'identification et la caractérisation de ces sous-populations ainsi qu'une meilleure compréhension de leur comportement et de leurs mécanismes cellulaires devient dès lors primordiale.

Les CSCs dans le NB

L'hétérogénéité des NBs est compatible avec le modèle des CSCs

De par son hétérogénéité biologique et son origine qui dérive d'une population cellulaire multipotente riche en cellules souches (les cellules de la crête neurale), le NB représente une tumeur potentiellement issue de CSCs. La littérature scientifique appuie également cette supposition. En effet, des études ont montré que certains marqueurs de cellules souches de crête neurale, comme p75 et SOX10, sont également exprimés par certaines sous-populations de cellules issues de NBs de stade IV (21). De plus, d'autres études ont démontré la présence d'une sous-population cellulaire possédant des caractéristiques de cellules souches au sein de tumeurs neuroblastiques (16). Smith et al. ont prouvé que la rapamycine, un inhibiteur de la voie de signalisation mTOR ciblant spécifiquement les cellules souches leucémiques, est également capable d'induire l'apoptose de cellules tumorales dans le cadre des NBs (22). Cette mort cellulaire a été mise en évidence *in vivo* par une réduction du poids tumoral chez les souris traitées et une diminution importante de la capacité d'auto-renouvellement ou de la faculté d'initiation tumorale des cellules exposées à cette drogue (23).

L'observation de la diversité phénotypique des lignées dérivant de NBs a permis de les classer en trois types cellulaires morphologiquement et biochimiquement différents, nommés S-type (substrate-adherent), N-type (neuroblastic) et I-type (intermediate). Les cellules de type N possèdent des caractéristiques dérivées des neurones neuroadrénergiques. Les cellules de type I expriment à la fois certaines propriétés des N et S-type (type cellulaire possédant des caractéristiques des cellules embryonnaires gliales, des cellules de Schwann et des mélanocytes). Les I-type semblent représenter les cellules souches tumorales de la crête neurale, dans la mesure où elles sont capables d'auto-renouvellement, de pluripotence, de clonogénicité et d'induction tumorale *in vivo* (24–26). Ces cellules représentent donc un outil intéressant pour l'étude *in vitro* des propriétés de potentielles CSCs du NB.

MDR1 dans le NB

Une analyse d'expression génique effectuée préalablement par microarray (Human Genome U133Plus 2.0 Affymetrix GeneChip oligonucleotide) dans le laboratoire a révélé une liste de gènes surexprimés dans des cellules de type CSCs, dont fait partie *mdr1* (8). Comme mentionné préalablement, MDR1 est une protéine de transport impliquée dans le mécanisme de résistance aux drogues. (9,10).

But du projet

Afin de tenter d'éclaircir le caractère résistant aux drogues des CSCs du NB, nous avons sélectionné des sous-populations cellulaires résistantes, en traitant par divers agents chimiothérapeutiques (cisplatine, doxorubicine, rapamycine et vincristine) cinq lignées différentes de neuroblastes. Dans le but d'évaluer un potentiel enrichissement en CSCs au sein de ces sous-populations par rapport aux populations contrôles non traitées, nous avons testé leurs fonctions d'auto-renouvellement et de clonogénicité. Ces propriétés ont été respectivement mises en évidence par la capacité des cellules à former des sphères de plusieurs générations dans des conditions de culture inhibant l'adhésion cellulaire et par la mesure de la croissance cellulaire en milieu semi-solide (soft agar essay). Une étude par cytométrie en flux de l'expression de MDR1 dans nos diverses populations a également été réalisée afin de mettre en évidence une potentielle surexpression de cette glycoprotéine au sein des cellules résistantes aux chimiothérapies.

MATERIELS ET METHODES

Lignées, milieux et culture cellulaire

Dans cette étude, cinq lignées cellulaires de NBs ont été choisies pour leurs caractéristiques respectives.

Lignées NB1: Trois différentes lignées cellulaires ont été établies à partir de cellules métastatiques infiltrant la moelle osseuse d'une tumeur de stade IV (selon les directives et autorisations de la commission d'éthique locale). Les lignées NB1-M5 et NB1-M5-NS ont été produites à partir de tumeurs induites dans des souris Swiss Nude par injections sous-cutanées. Des passages successifs dans la souris ont été réalisés (souris M1 à M5) (figure 3).

Les cellules de la lignée NB1-M5 sont cultivées dans le DMEM-10% SVF, milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (Sigma, Taufkirchen, Germany), 100 U/ml de pénicilline et 100ug/ml de streptomycine (Invitrogen). La lignée NB1-M5-NS est établie dans un milieu de culture défini pour les CSCs, le NBM (Neural Basic Medium). Il est composé de DMEM/F12 supplémenté par de la pénicilline, de la streptomycine, 2% de B27 (Gibco), du β FGF humain (20 ng/mL; Peprtech, USA) et du EGF (20 ng/mL; Peprtech).

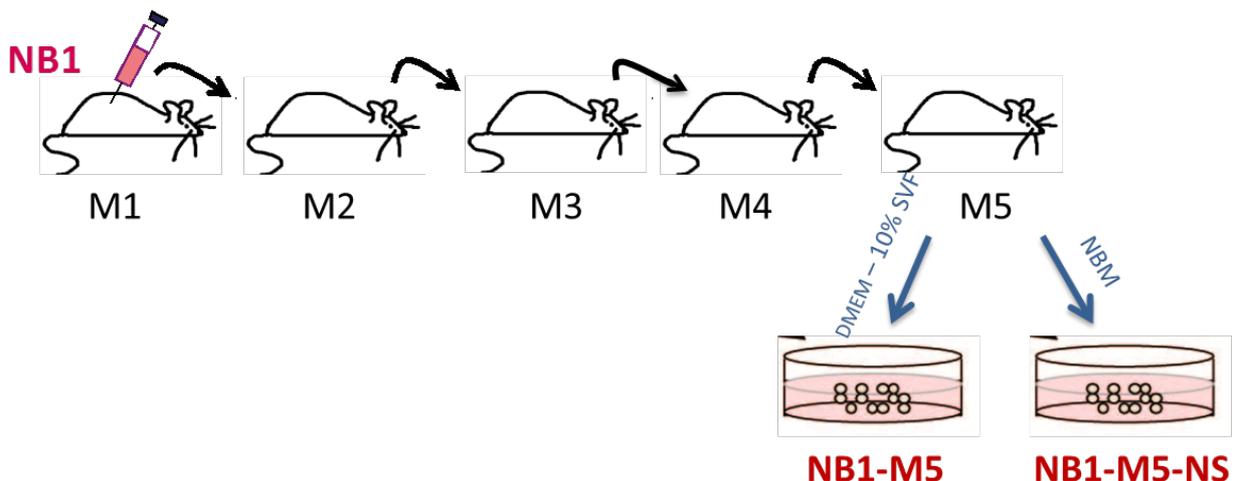


Figure 3 : Lignées NB1-M5 et NB1-M5-NS

Les lignées NB1-M5 et NB1-M5-NS sont établies à partir d'échantillons de moelle osseuse d'un patient avec un NB métastatique préalablement inoculés par injections sous-cutanées dans une souris Swiss Nude. Des passages successifs dans la souris de la tumeur NB1 sont effectués afin de maintenir la tumeur NB1 et de disposer de suffisamment de matériel tumoral. La tumeur a été dissociée au passage 5 (M5 pour « mouse 5») pour obtenir une suspension cellulaire. Les lignées NB1-M5 et NB1-M5-NS résultent de la culture de ces cellules dans le milieu DMEM -10% SVF et le milieu NBM respectivement.

Finalement, la lignée NB1-M-REC, également cultivée dans le milieu DMEM-10% SVF, a été établie à partir des cellules métastatiques du patient NB1 à la rechute. Les cellules des lignées NB1-M5 et NB1-M5-NS, qui proviennent de matériel prélevé lors du diagnostic initial, n'ont été exposées à aucune chimiothérapie. En revanche, les cellules de la lignée NB1-M-REC ont été en contact avec plusieurs cures de chimiothérapies à base de vincristine,

étoposide, cisplatine, cyclophosphamide, doxorubicine, topotecan et carboplatine, en accord avec les protocoles de traitements HR-NBL-1/ESIOP et VAC (27).

LAN-1 et SK-N-Be(2)c : Ces deux lignées proviennent de la moelle osseuse métastatique de NBS de stade IV (28). Ces cellules ont été exposées à plusieurs cures de chimiothérapies (vincristine, cyclophosphamide, dimethyltriazenoimidazolecarbozamide et adriamycine). Elles sont cultivées dans le milieu DMEM-10% SVF.

Les lignées sont passées chaque 3-4 jours à l'aide de 0.05% trypsin-EDTA (Gibco). La digestion enzymatique est stoppée par l'ajout de DMEM-10% SVF, excepté pour les cellules cultivées dans le NBM, pour lesquelles un inhibiteur de trypsine (from Glycin max, Sigma) est utilisé.

Culture de sphères

La culture en sphères exige un milieu spécialement adapté pour la croissance des cellules souches de la crête neurale et de ses progéniteurs, le NCSC (neural crest stem cell medium). Il est élaboré à partir de DMEM-F12, 20 ng/ml de FGF2, 20 ng/ml d'IGF1, 20 ng/ml de EGF (all Peprotech), 1% de N2 supplément, 2% de B27, 1% de Pénicilline/Streptomycine (all Invitrogen), 50 μ M de 2-mercaptoethanol, 35 ng/mL d'acide rétinolique (Sigma) et 15% d'extrait d'embryons de poulets (CEE).

Les cellules sontensemencées à une concentration de 50'000 cellules/ml/puits dans les puits d'une plaque 6-puits contenant 3ml de milieu NCSC, et préalablement recouverts de poly(2-hydroxyethyl methylacrylate) (Sigma) pour prévenir toute adhésion cellulaire (stock dilué à une concentration de 16 mg/mL dans l'éthanol). Les cellules en suspension sont incubées à 37°C en présence de 0.5% de CO₂. Un passage hebdomadaire des sphères est réalisé en les dissociant par trypsinisation. Après dissociation, les cellules sont passées au travers d'un filtre CellTricks (50- μ m, Partec) pour obtenir une suspension monocellulaire, comptées etensemencées de nouveau dans une plaque 6 puits (27).

Le ratio de survie cellulaire des sphères après chaque passage est calculé en divisant le nombre de cellulesensemencées à l'origine par le nombre de cellules vivantes dans les sphères.

Tests de viabilité cellulaire et réponse aux drogues

Des tests de viabilité cellulaire et réponse aux drogues (doxorubicine, vincristine, cisplatine, rapamycine) ont été effectués avec chacune des lignées, afin d'établir la concentration de drogue toxique pour 80% des neuroblastes (LD 80). Un indice de toxicité cellulaire élevé permet la sélection d'un pool de cellules hautement résistantes à de fortes doses de chimiothérapie.

Pour l'induction de la mort cellulaire, les suspensions de cellules tumorales (30'000 cellules/puits sur une plaque de 96 puits) ou sphères dissociées sont mises en culture dans leurs milieux respectifs (100 μ l de DMEM, NBM ou NCSC) 24 heures avant un traitement de 48 heures avec la cisplatine, la doxorubicine, la rapamycine et la vincristine à des doses variables (entre 4 et 50 μ g/ml pour la cisplatine ; entre 0.05 et 2 μ g/ml pour la doxorubicine ; entre 0.0001 et 100 μ M pour la vincristine ; entre 0.01 et 100 μ M pour la rapamycine). La

viabilité cellulaire est mesurée en quadruplicats en utilisant le MTS/PMS cell proliferation kit de Promega (Madison, WI, USA). Il s'agit d'un test colorimétrique permettant de déterminer le nombre de cellules viables. L'activité métabolique des cellules vivantes, réduit le MTS en un métabolite coloré, le formazan dont on mesure le signal. Le pourcentage de cellules viables dans le groupe traité est comparé au pourcentage de viabilité de cellules non traitées (29).

Une fois le LD 80 établi pour chacune des lignées, celles-ci sont mises en culture dans des boîtes T75, pendant 24 heures, en présence de leur milieu respectif. Le jour suivant, le milieu est remplacé par du milieu propre (contrôle) ou du milieu additionné des drogues. Après 48 heures, les cellules adhérentes sont décollées par trypsinisation et comptées.

Tests clonogéniques en soft agar

Le test est effectué en duplicat sur une plaque de 6 puits (6-wells). 6'000 cellules/puits sont suspendues dans 0.175% d'agar (Difco™ Agar Noble, BD Biosciences, MA, USA), dilué dans du milieu DMEM ou du milieu NBM concentrés deux fois. Cette préparation est ensuite coulée par-dessus une première couche « solidifiée » d'agar acellulaire à 0.35%. Les boîtes sont incubées à 37°C en présence de 0.5% de CO₂, pendant 20 à 40 jours selon la lignée. 100 µl/puits de milieu frais sont ajoutés chaque semaine (30). La viabilité cellulaire des clones formés est évaluée à l'aide du MTS/PMS cell proliferation kit (Promega). Les clones sont ensuite comptés.

Préparation cellulaire pour la cytométrie en flux (FACS)

Les cellules comptées sont transférées dans un tube de 5ml, lavées deux fois dans du PBS contenant 0.5% d'albumine de sérum bovin (BSA) et 2 mmol/L-EDTA. Elles sont marquées avec l'anticorps monoclonal conjugué MDR1-PE (P-glycoprotéine, clone UIC2, Beckman Coulter, USA). La préparation (dont la dilution appropriée des anticorps suit les recommandations du fabricant) est incubée pendant 20 minutes à 6°C, puis lavée deux fois avec le PBS. 10'000 cellules au total sont analysées par le FACSArial™ cellsorter (BD Biosciences, USA).

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de GraphPad Prism 4.0 (La Jolla, CA, USA) sur la base du Student's t-test. *p<0.05 représente la significativité, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 démontre une haute significativité.

RESULTATS

Le profil de réponse aux agents cytotoxiques est propre à chaque lignée.

Afin de définir pour chaque drogue l'index de cytotoxicité ou la concentration de drogue nécessaire pour tuer 80% des neuroblastes malins (LD 80), des tests de viabilité cellulaire ont été effectués avec les lignées SK-N-Be(2)c, LAN-1 et les trois lignées dérivées de NB1. Les cellules sont incubées pendant 48h en présence de quatre agents cytotoxiques : la cisplatine, la doxorubicine, la vincristine et la rapamycine. Les doses utilisées varient de 0.05 à 2 µg/ml pour la doxorubicine, de 4 à 40 µg/ml pour la cisplatine, de 0.0001 à 10 µM pour la vincristine et de 0.01 à 100 µM pour la rapamycine.

La figure 4 montre que, le LD 80 est très variable selon la lignée et la drogue. En effet, le LD 80 est atteint à une concentration de 36 µg/ml de cisplatine pour la lignée LAN-1, alors qu'il correspond à des doses de 32 µg/ml et 40 µg/ml respectivement pour les lignées SK-N-Be(2)c et NB1-M5. Pour les traitements à la doxorubicine, le LD 80 est de 2 µg/ml pour les LAN-1, de 0.5 µg/ml pour les NB1-M5 et se situe au-delà de 2 µg/ml pour les SKN-Be(2)c. Enfin, 10 µM de vincristine correspondent à un LD 80 pour les LAN-1 et les SK-N-Be(2)c, alors qu'il se situe au-delà de 10 µM pour les NB1-M5.

Concernant la rapamycine, la détermination du LD 80 est rendue difficile par le manque de doses intermédiaires entre 30 et 100 µM. Or, il semble se situer pour la plupart des lignées dans cet intervalle.

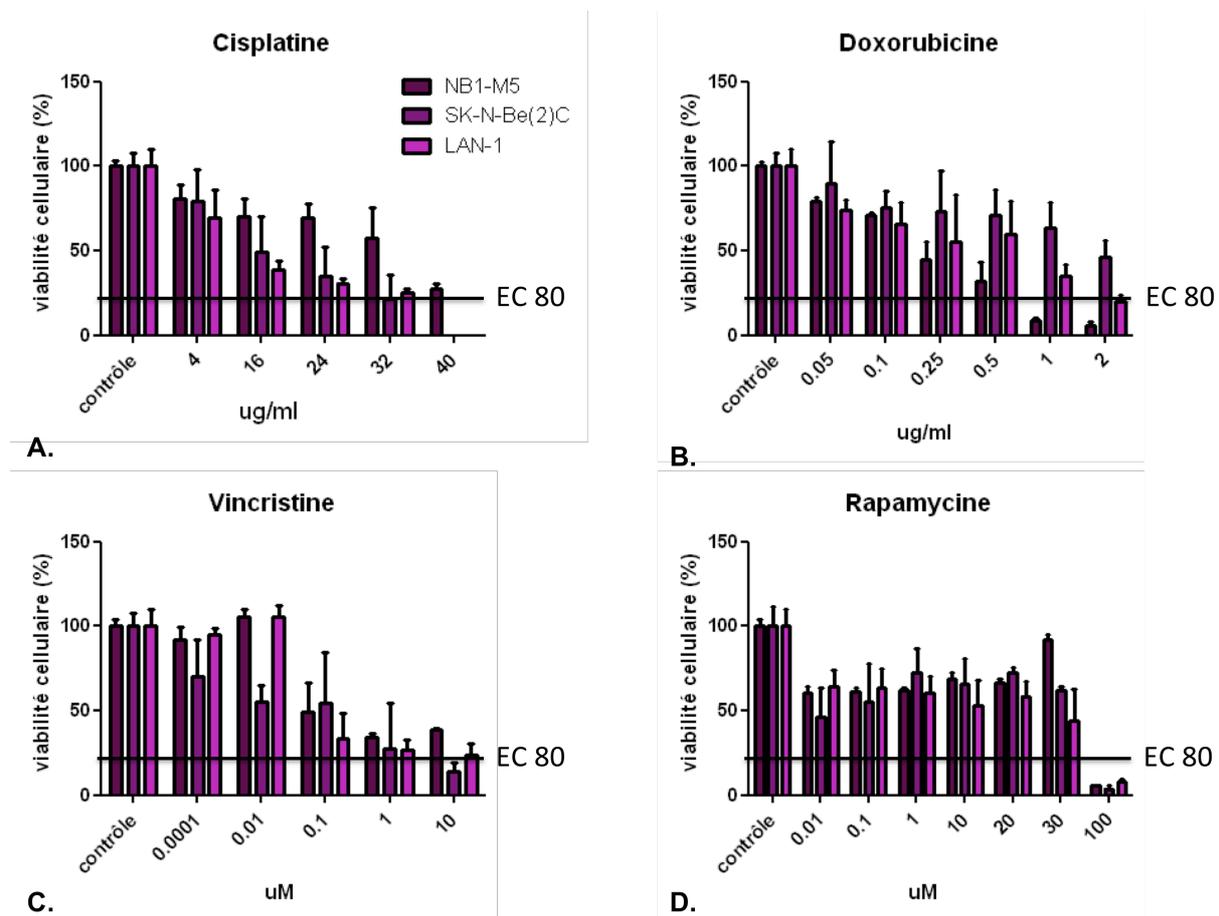


Figure 4 : Le LD 80 est spécifique à chaque lignée.

A-C. Le LD 80 est atteint pour la lignée LAN-1 (respectivement SK-N-Be(2)c ; NB1-M5) aux concentrations suivantes : 36 (32 ; 40) $\mu\text{g/ml}$ de cisplatine, 2 (>2 ; 0.6) $\mu\text{g/ml}$ de doxorubicine et 10 (10 ; >10) μM de vincristine. **D.** La détermination du LD 80 pour la rapamycine est rendue difficile par le manque de doses intermédiaires entre 30 et 100 μM . Aucune analyse statistique n'a été effectuée sur ces graphiques. L'expérience a été réalisée en triplicats, dont les déviations standards sont indiquées par les barres d'erreurs.

L'effet du type cellulaire sur le profil de réponse aux drogues

Les lignées de NBs se divisent en trois types cellulaires nommés I-type, N-type et S-type. Afin de mettre en évidence une divergence de comportement possiblement incriminable au type cellulaire, nous avons comparé le profil de réponse aux drogues des LAN-1 (N-type) avec les SK-N-Be(2)c (I-type). Les résultats montrent la tendance des SK-N-Be(2)c à être plus résistantes que les LAN-1 à des doses élevées (>1 $\mu\text{g/ml}$) de doxorubicine (à 1 $\mu\text{g/ml}$: 60% vs 40% de survie) et à la cisplatine à la concentration de 16 $\mu\text{g/ml}$ (50% vs 39% de survie) (figure 4). Cependant, l'effet inverse s'observe à certaines concentrations de vincristine. Les LAN-1 sont plus résistantes que les SK-N-Be(2)c, lorsqu'elles sont exposées à 0.01 μM de vincristine (100% vs 52%). En conclusion, la sensibilité aux drogues n'est pas liée au type cellulaire, mais est lignée-dépendante.

L'effet du milieu de culture sur le profil de réponse aux drogues

Nous avons comparé la réponse aux drogues de deux des lignées dérivées de NB1 (NB1-M5 et NB1-M5-NS), afin de mettre en évidence un éventuel changement de comportement cellulaire induit par un milieu de culture différent, ainsi que de mieux caractériser leurs propriétés respectives de résistance aux drogues (figure 5). Les NB1-M5 ont été établies dans un milieu inducteur de différenciation cellulaire (DMEM-10%) alors que les NB1-M5-NS ont été cultivés dans un milieu défini qui maintient les cellules dans un état d'indifférenciation.

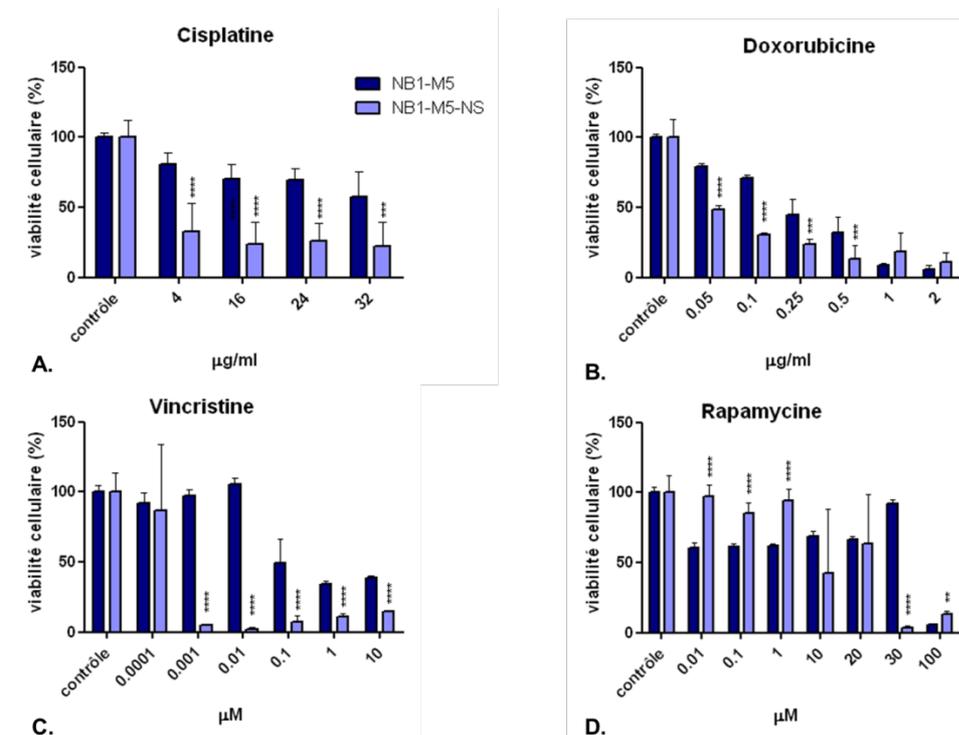


Figure 5 : Le profil de réponse aux drogues diffère entre NB1-M5 et NB1-M5-NS.

A-C. Les cellules poussant dans le milieu NBM sont significativement plus sensibles à la cisplatine (à 16 µg/ml : 23% vs 70% de survie), à la doxorubicine (à 0.1 µg/ml : 30% vs 71% de survie), et à la vincristine (à 1 µM : 7% vs 50% de survie). **D.** Le profil de sensibilité à la rapamycine varie en fonction de la concentration. ** signifie $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, l'absence d'étoile signifie que le résultat est non significatif. L'expérience a été réalisée en triplicats, dont les déviations standards sont indiquées par les barres d'erreurs.

Pour les cellules cultivées dans le NBM, on observe une sensibilité significativement plus importante à la doxorubicine (à 0.1 µg/ml : 30% vs 71% de survie), à la cisplatine (à 16 µg/ml : 23% vs 70% de survie) et à la vincristine (à 1 µM : 7% vs 50% de survie), par rapport aux cellules cultivées dans le DMEM. Les résultats obtenus avec la rapamycine varient en fonction de la concentration de la drogue. Les NB1-M5-NS sont plus résistantes que les NB1-M5 entre 0.01 et 1 µM de rapamycine, alors qu'entre 10 et 30 µM elles sont plus sensibles. La tendance s'inverse de nouveau à la concentration de 100 µM, ne permettant pas de conclure sur une plus grande sensibilité d'une lignée sur l'autre.

Les résultats obtenus lors des tests de viabilité cellulaire effectués sur la lignée NB1-M-REC sont trop variables au sein des mêmes quadruplicats pour être exposés et discutés dans cette étude.

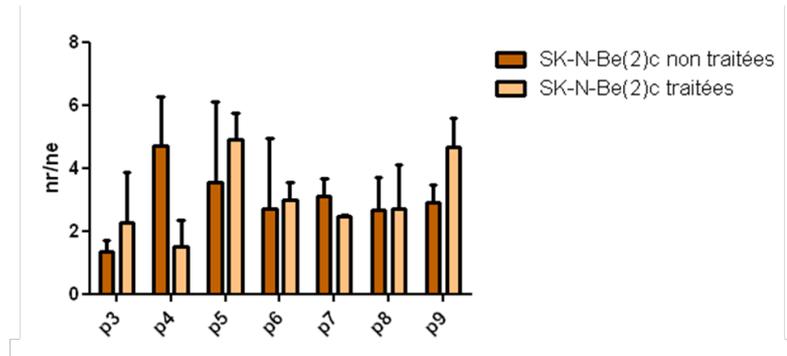
Les cellules traitées ne possèdent pas une capacité d'auto-renouvellement supérieure aux cellules contrôles.

Dans le but de mettre en évidence un enrichissement potentiel en CSCs au sein des sous-populations cellulaires résistantes aux drogues, nous avons testé leurs fonctions d'auto-renouvellement à l'aide du modèle des sphères.

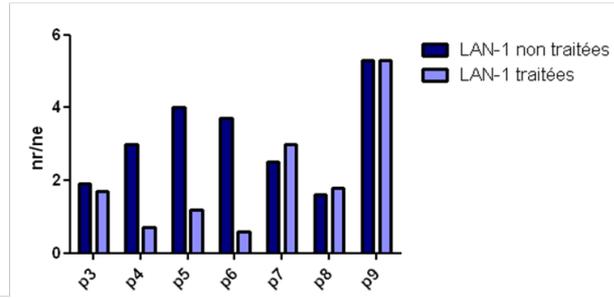
Les résultats précédents ayant mis en évidence une fragilité probable des cellules traitées avec des drogues, l'expérience a été réalisée avec des cellules cultivées en adhérence durant 3 à 7 jours après traitement pour leur laisser un temps de récupération en culture avant d'analyser leurs propriétés d'auto-renouvellement.

Parmi les cinq lignées étudiées, toutes forment des sphères jusqu'à un nombre de passage élevé (supérieur à dix passages), excepté NB1-M5, avec ou sans traitement. Cette dernière, qui possède une capacité d'auto-renouvellement limitée, est incapable d'aller au-delà du deuxième passage.

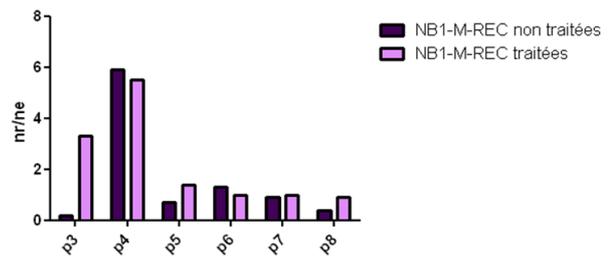
Nous avons, par la suite, analysé les dissemblances entre les populations traitées et non traitées. La figure 6 illustre la grande variabilité dans le nombre de sphères formées entre chaque passage pour une même lignée, sans qu'une cinétique particulière puisse être mise en évidence. Cette variation se retrouve autant dans les populations contrôles que celles traitées avec de la cisplatine pour SK-N-Be(2)c et de la doxorubicine pour LAN-1 et NB1-M-REC aux concentrations permettant d'atteindre le LD 80. Ainsi de manière aléatoire, lors de certains passages, les cellules contrôles génèrent une plus grande quantité de sphères que les cellules sélectionnées par les drogues et inversement, ne permettant pas de conclure à une différence significative du caractère d'auto-renouvellement entre ces deux populations.



A.



B.



C.

Figure 6 : Les cellules traitées ne forment pas un nombre de sphères supérieur par rapport aux cellules non traitées

A-C : Il existe une dissemblance dans le nombre de sphères formées par les cellules non traitées et traitées avec de la cisplatine 32 µg/ml pour les SK-N-BE(2)c, de la doxorubicine 2 µg/ml pour les LAN-1 et 0.5 µg/ml pour NB1-M-REC. Cette différence varie d'un passage à l'autre et ne permet donc pas de conclure à une capacité d'auto-renouvellement supérieure d'une population par rapport à l'autre.

Nr/ne : nombre de cellules récoltées sur le nombre de cellules ensemencées. P : passage. Pour le graphique A, les résultats ne sont pas significatifs. L'expérience a été réalisée en duplicat, dont les déviations standards sont indiquées par les barres d'erreur. Pour les graphiques B et C, l'expérience a été réalisée en monoplicat.

Toutefois, la morphologie des sphères permet de distinguer les cellules contrôles des cellules traitées. La figure 7 illustre qu'au sein d'une même lignée, les sphères de la population contrôle sont plus rondes avec un pourtour mieux délimité que les sphères de la population traitée pour un même nombre de passages.

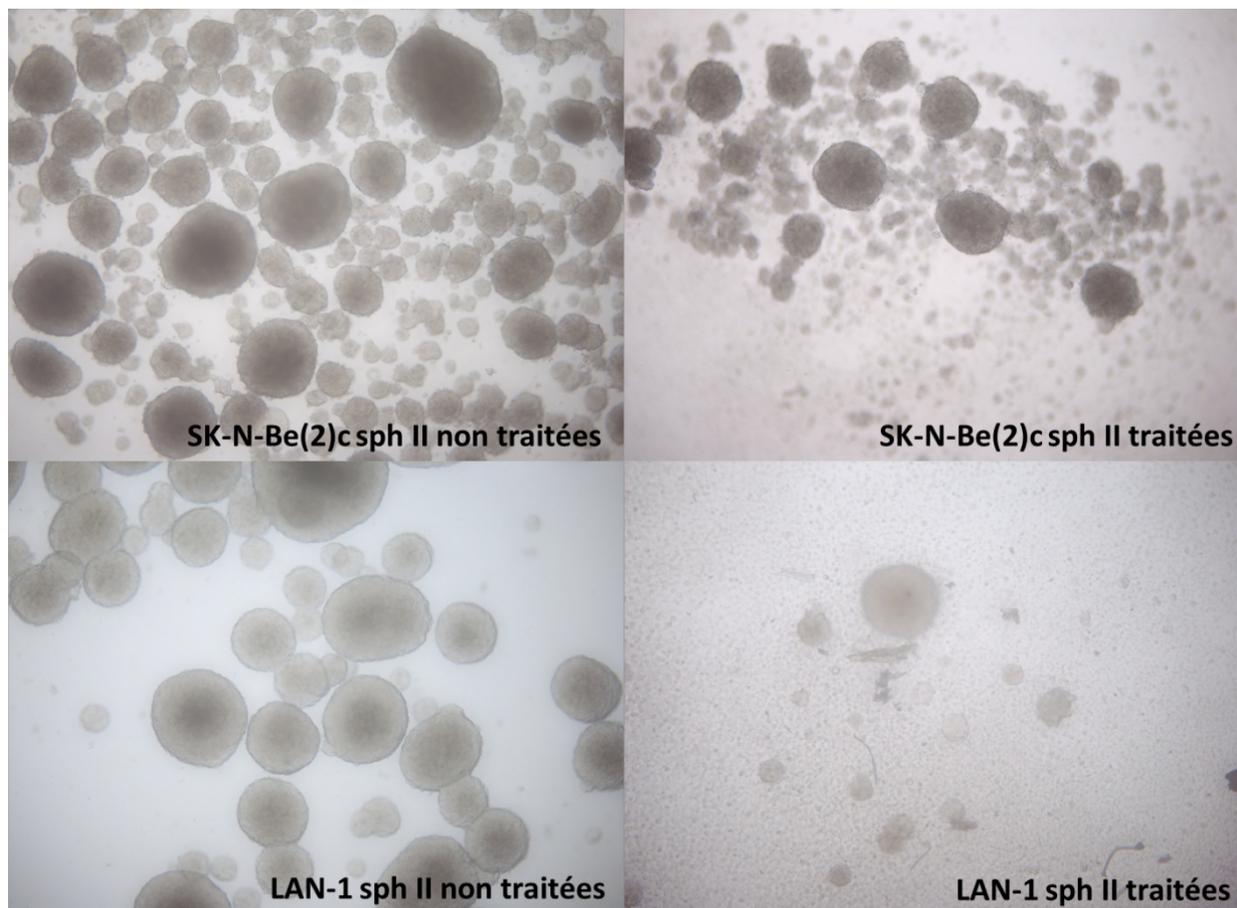


Figure 7: la morphologie des sphères varie entre les cellules contrôles et les cellules traitées.

Les sphères secondaires sont observées à un grossissement microscopique de 40x. Elle sont dérivées des populations cellulaires SK-N-Be(2)c et LAN-1 contrôles et traitées par de la cisplatine 32 $\mu\text{g/ml}$ et respectivement, par de la doxorubicine 2 $\mu\text{g/ml}$.

Les cellules traitées possèdent des propriétés moindres de clonogénicité par rapport aux cellules contrôles.

Aucune différence significative dans la capacité d'auto-renouvellement entre les cellules du groupe contrôle et celles du groupe traité n'ayant été observée, nous nous sommes intéressés à leurs propriétés de clonogénicité, caractéristique propre aux CSCs.

Tout comme pour les sphères, les cellules ont bénéficié d'un temps de récupération de 3 à 7 jours dans leur milieu respectif sans drogue avant de débiter les tests clonogéniques.

NB1

Les tests clonogéniques effectués sur les lignées NB1-M5, NB1-M5-NS et NB1-M-REC n'ont pas produit de colonies. Par ailleurs, suite au traitement par vincristine, doxorubicine ou cisplatine aucune de ces trois lignées dérivées de NB1 n'a acquis de nouvelle propriété clonogénique.

LAN-1/SK-N-Be(2)c

Les LAN-1 et les SK-N-Be(2)c possèdent un caractère clonogénique propre en l'absence de tout traitement, démontré par la production de colonies en milieu semi-solide. Dès lors, nous avons effectué des tests clonogéniques sur ces cellules avec ou sans traitement. Les résultats montrent que les cellules traitées avec la cisplatine 36 µg/ml pour les LAN-1 et la vincristine 10 µM pour les SK-N-Be(2)c engendrent un nombre de clones significativement inférieur aux cellules contrôles. En effet, on dénombre 73 clones dans la population contrôle contre 22 pour la population traitée après 24 jours d'incubation de la lignée LAN-1 dans le soft agar. Les SK-N-Be(2)c forment 230 clones pour la population non traitée contre 24 pour les cellules traitées après 20 jours d'incubation. Ces chiffres représentent une moyenne des colonies dénombrées. (figure 8).

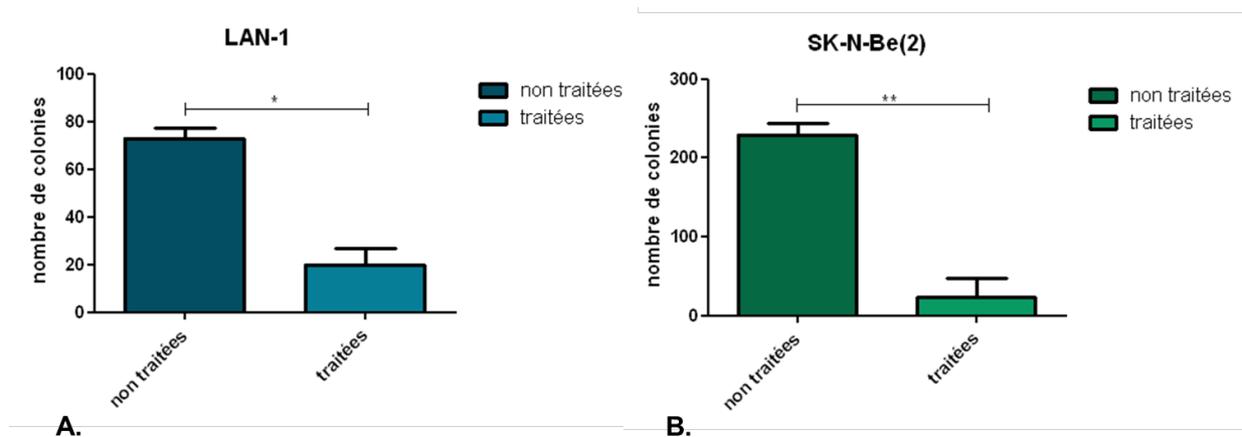


Figure 8 : Les cellules traitées possèdent des propriétés de clonogénicité diminuée par rapport aux cellules contrôles.

A. Les cellules de la lignée LAN-1 traitées avec la cisplatine 36 µg/ml engendrent un nombre de colonies significativement inférieur aux cellules contrôles (73 dans la population contrôle vs 22 pour la population traitée après 24 jours d'incubations). **B.** On observe un résultat identique aux LAN-1 avec la lignée SK-N-Be(2)c traitée par de la vincristine 10 µM (230 colonies dans la population contrôle vs 24 après 20 jours d'incubation). * signifie $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. L'expérience a été réalisée en duplicats, dont les déviations standards sont indiquées par les barres d'erreur.

Les sphères dérivant des cellules de la lignée SK-N-Be(2)c traitées ont acquis un caractère résistant aux diverses chimiothérapies.

Afin de confirmer que le traitement de départ a réellement sélectionné une population cellulaire distincte de la population contrôle, nous avons pour la dernière partie de cette étude effectué des tests de viabilité cellulaire sur les sphères de la lignée SK-N-Be(2)c à un passage avancé (dix-neuvième passage). Des résultats illustrant une dissemblance dans la réponse aux drogues parleraient en faveur de l'existence de deux populations différentes, possédant leurs caractéristiques propres.

Lors de cette expérience, les conditions (drogues, concentrations et temps d'incubation) sont identiques à celles réalisées lors des tests de viabilité cellulaire accomplis préalablement sur

les cellules adhérentes. Les résultats, illustrés par la figure 9, montrent la tendance des sphères, qui dérivent des cellules exposées à la cisplatine, à être plus résistantes aux différentes drogues que les sphères contrôles. Cette propriété s'observe de manière significative avec la vincristine (quelle que soit la concentration), mais pas avec la cisplatine, la doxorubicine ou la rapamycine.

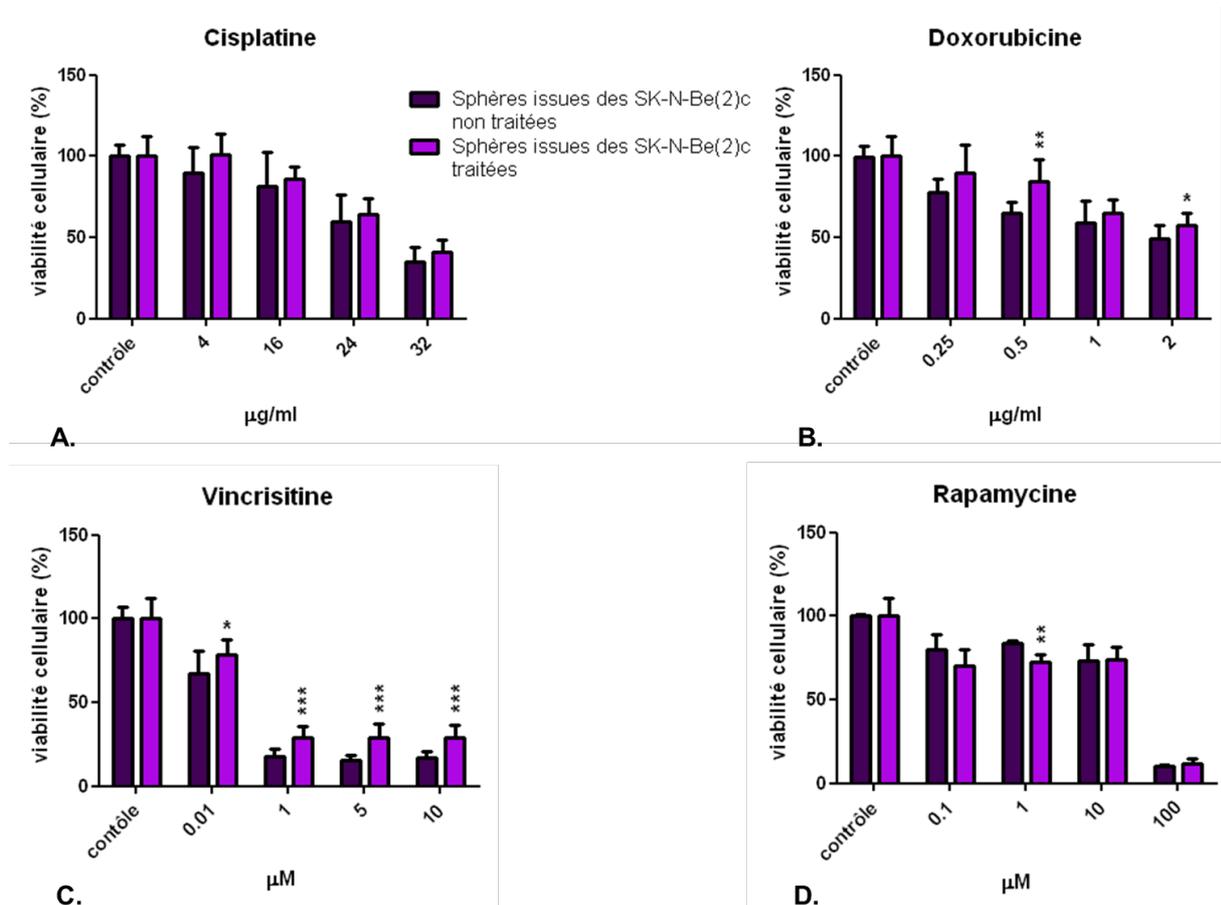


Figure 9 : Les sphères dérivant des cellules traitées ont acquis un caractère résistant aux diverses chimiothérapies.

A-B. Les tests de viabilité cellulaire effectués sur les sphères formées à partir des cellules de la lignée SK-N-BE(2)c exposées à la cisplatine 32 µg/ml, illustrent la tendance de ces dernières à être plus résistantes à la cisplatine et à la doxorubicine que les sphères contrôles. **C.** Cette propriété s'observe de manière significative avec la vincristine pour toutes les doses testées. **D.** Les résultats obtenus avec la rapamycine varient en fonction de la dose utilisée. * signifie $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, l'absence d'étoile signifie que les résultats sont non significatifs. L'expérience a été réalisée en duplicats, dont les déviations standards sont indiquées par les barres d'erreur.

L'expression de MDR1 ne varie pas entre la population contrôle et la population traitée.

Connaissant l'implication probable du gène *mdr1* au sein des CSCs ainsi que son rôle joué dans les mécanismes de résistance aux drogues, nous avons choisi d'étudier son expression dans nos populations cellulaires.

Dans un premier temps, nous avons comparé le niveau d'expression basal de la glycoprotéine MDR1 dans les diverses lignées. Puis, nous avons investigué l'existence d'une surexpression de MDR1 dans les populations traitées, reflet d'un probable enrichissement en CSCs résistantes.

NB1

Les analyses effectuées sur les trois lignées non traitées de NB1 montrent une expression variable du MDR1 (figure 10). NB1-M5 n'exprime pas de MDR1 (3%), contrairement à NB1-M5-NS et NB1-M-REC qui en expriment respectivement 18% et 99.5%.

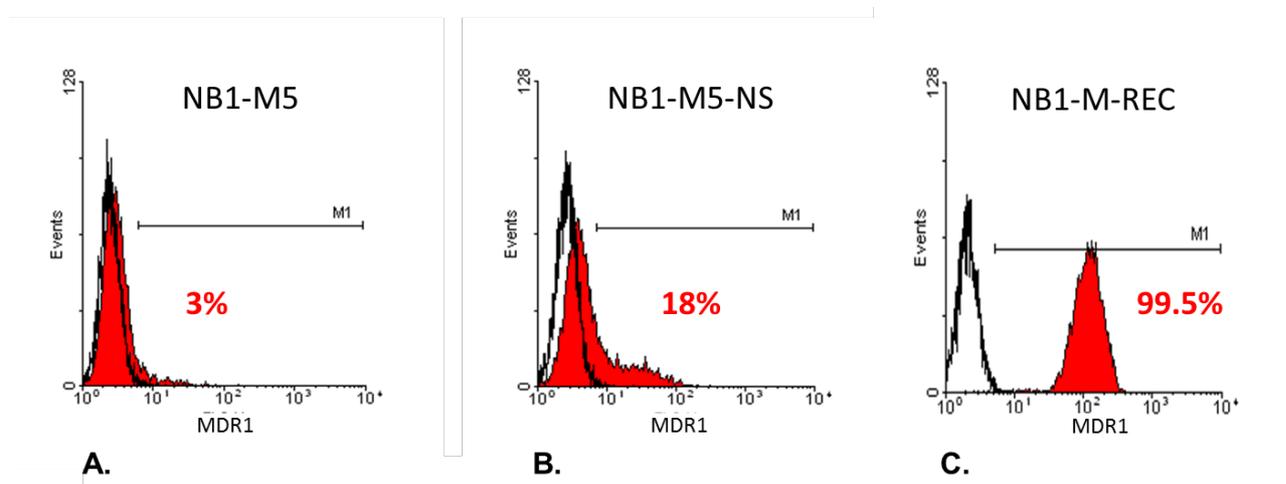


Figure 10 : L'expression de MDR1 varie parmi les trois lignées établies à partir de NB1.

A. La cytométrie en flux avec marquage par l'anticorps MDR1-PE révèle que seules 3% des cellules de la lignée NB1-M5 expriment le MDR1. **B.** 18% des NB1-M5-NS expriment MDR1. **C.** Près de 100% des cellules de la lignée provenant de la rechute tumorale expriment le MDR1.

En revanche, nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation significative de l'expression de la glycoprotéine MDR1 dans la population traitée, le taux de celle-ci demeurant stable.

LAN-1/SK-N-Be(2)c

70% des LAN-1 expriment le MDR1, alors qu'il est exprimé dans 100% des cellules de la lignée SK-N-Be(2)c. Ces chiffres n'étant pas modifiés suite aux divers traitements cytotoxiques, aucune modification significative dans le pourcentage des cellules exprimant cette protéine de transport n'est mise en évidence entre les populations cellulaires traitées et non traitées pour ces deux lignées. Il en est de même pour l'intensité d'expression, une cellule pouvant exprimer faiblement ou fortement le MDR1, qui demeure stable malgré l'exposition aux chimiothérapies.

DISCUSSION

Les différents profils de résistance aux drogues reflètent l'hétérogénéité des lignées de NBs et dépendent des milieux de culture cellulaire.

Les lignées LAN-1, SK-N-Be(2)c et les trois lignées dérivées de NB1 sont connues pour leur comportement hautement agressif. Cette propriété est mise en évidence par la forte résistance qu'elles exercent face aux diverses chimiothérapies. De plus, elles proviennent de NBs de stade IV, stade associé au moins bon pronostic. Bien qu'elles présentent toutes une résistance aux agents cytotoxiques utilisés dans cette étude, il existe une variation du profil de réponse aux drogues en fonction de la lignée. Cette différence est soulignée par la gamme de doses de chimiothérapies nécessaire à l'atteinte du LD 80 selon la lignée. Ceci est le reflet de l'hétérogénéité biologique du NB.

Il existe également une variation de la réponse aux drogues en fonction du milieu cellulaire. Provenant du même échantillon de cellules neuroblastiques, NB1-M5 et NB1-M5-NS présentent comme seule différence leur milieu de culture. Or, leur réponse respective aux diverses chimiothérapies utilisées dans le cadre de cette étude est significativement distincte, illustrant le rôle joué par le milieu cellulaire dans le processus de résistance aux drogues.

Les cellules du NB possèdent des caractéristiques s'apparentant aux CSC.

Bien que les recherches actuelles ne soient pas encore parvenues à mettre en évidence et à caractériser des CSCs dans le NB, plusieurs rapports font état de la présence dans le NB de cellules à caractère souche (8,23,31). Nous avons pu observer la présence de ces cellules s'apparentant aux CSCs au sein de nos populations cellulaires non traitées.

Les lignées SK-N-Be(2)c et LAN-1 possèdent un grand nombre de caractéristiques communes, s'apparentant à celles des CSC, telles que leur capacité de clonogénicité, celle d'auto-renouvellement démontrée par leur faculté à former des sphères à un passage élevé et une forte expression du gène *mdr1*. Toutefois, elles se distinguent l'une de l'autre par leur type cellulaire, les SK-N-Be(2)c appartenant aux cellules de type I alors que les LAN-1 sont de type N. La plus grande viabilité cellulaire des SK-N-Be(2)c au contact de doses élevées de doxorubicine par rapport aux LAN-1 pourrait être en partie expliquée par le caractère souche acquis des I-type. Sachant que MDR1 est impliqué dans les mécanismes de résistance à la doxorubicine, cette dissemblance pourrait également provenir du taux d'expression du MDR1 plus important chez les SK-N-Be(2)c que chez les LAN-1 (100% de cellules positives vs 70% respectivement). D'un point de vue global, les résultats obtenus en présence des quatre drogues (cisplatine, doxorubicine, vincristine, rapamycine) ne montrent pas un caractère significativement plus résistant des I-type sur les N-type, ne nous permettant pas de conclure à une plus grande résistance aux drogues des I-type. Toutefois, les tests clonogéniques effectués sur ces deux lignées montrent une plus grande capacité clonogénique des SK-N-Be(2)c que des LAN-1 (230 vs 73 clones respectivement). Cette

propriété des I-type a déjà été démontrée par Ross et al., témoignant du plus grand potentiel de malignité des I-type (25).

Concernant les trois lignées dérivant de NB1, nous avons mis en évidence un comportement et un profil d'expression génique variable.

La lignée NB1-M5-NS se distingue de la lignée NB1-M5 uniquement par son milieu de culture NBM, qui est défini pour les cellules souches de crête neurale. L'étude de ces deux lignées nous a permis d'observer la différence de comportement cellulaire et d'expression du MDR1 induite par le milieu de culture. NB1-M5-NS a la faculté de former des sphères jusqu'à un passage élevé (au-delà du vingtième passage), alors que NB1-M5 ne possède pas de capacité d'auto-renouvellement. Cette observation peut s'expliquer par un enrichissement en cellules de type CSCs de la lignée NB1-M5-NS induit par son milieu de culture. La surexpression de MDR1 chez NB1-M5-NS par rapport à NB1-M5 (18% vs 3% respectivement), est également en faveur de la présence d'une population cellulaire tumorale de type souche plus importante au sein de la lignée cultivée dans le milieu NBM. Une incapacité de former des colonies en milieu semi-solide est observée pour ces deux lignées, démontrant ainsi qu'elles ne possèdent pas de propriétés clonogéniques. Par ailleurs, lors de la comparaison de leur profil de réponse aux drogues, la sensibilité significativement plus importante de la lignée NB1-M5-NS pour la cisplatine, la doxorubicine et la vincristine témoigne d'une résistance moindre de cette lignée. Malgré cette constatation, nous ne remettons pas en question l'amplification en cellules de type CSC dans la lignée NB1-M5-NS, les résultats discutés préalablement n'allant pas dans ce sens. De plus, cet enrichissement a également été démontré par Coulon et al (8). Dès lors, ces observations pourraient être l'illustration qu'une autre population cellulaire, différente des CSC, joue également un rôle prépondérant dans le mécanisme de résistance aux drogues. Le profil de réponse à la rapamycine, cible spécifique des cellules de type CSC du NB, est difficile d'interprétation car il existe des variations en fonction de la concentration de la drogue.

Newton et al. ont démontré que les cellules provenant d'une rechute tumorale possédaient un nombre de CSC plus important que les cellules résultant de la tumeur au diagnostic initial (32). En étudiant la lignée NB1-M-REC, nous avons également pu mettre en évidence cette tendance. En effet, ces cellules sont capables, d'une part d'élaborer des sphères jusqu'à un nombre de passages élevé et d'autre part, elles expriment fortement le MDR1 (99.5%). Partant de l'hypothèse selon laquelle MDR1 serait un marqueur possible des CSC du NB, ces résultats illustreraient un enrichissement des lignées NB1-M5-NS et NB1-M-REC en CSC. Pour les cellules provenant de la rechute tumorale (NB1-M-REC), l'amplification de MDR1 s'explique également partiellement par le fait que ces neuroblastes ont été en contact avec certaines chimiothérapies notamment la doxorubicine, induisant une augmentation de l'expression du MDR1 comme mécanisme de résistance (33). Tout comme les deux autres lignées dérivées de NB1, NB1-M-REC ne possède pas de faculté clonogénique.

Le LD 80 a sélectionné deux populations cellulaires distinctes

Dans le but de confirmer que le traitement initial a réellement sélectionné une population cellulaire différente de la population contrôle, et qu'il ne s'agit pas en réalité de la même population, des tests de viabilité cellulaire ont été effectués sur les sphères de la lignée SK-N-Be(2)c à un passage avancé (dix-neuvième passage). Les résultats, qui montrent une

dissemblance dans la réponse aux drogues entre les populations traitée et non traitée, évoquent l'existence de deux populations distinctes, possédant leurs caractéristiques propres.

Ces deux populations se différencient également par la morphologie de leurs sphères, ainsi que par leur capacité de clonogénicité. Toutefois, ces résultats correspondent probablement plus à l'effet du traitement sur les cellules, les rendant ainsi plus fragiles et ceci malgré le temps de récupération, qu'à l'illustration d'une dichotomie comportementale entre ces deux populations.

Un enrichissement en CSCs n'a pas été mis en évidence dans la population traitée par rapport à la population contrôle.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ne rapportent pas de signes d'enrichissement en cellules possédant des caractéristiques de CSCs dans la population traitée par rapport à la population non traitée. En effet, bien qu'il existe des dissemblances entre ces deux populations dans leur capacité à former des sphères, celles-ci ne sont d'une part pas significatives, et d'autre part trop variables, rendant toute interprétation difficile. Il existe une grande fluctuation dans le nombre de sphères formées entre chaque passage pour une même lignée, sans qu'une cinétique particulière puisse être mise en évidence. Cette observation se retrouve autant dans les populations contrôles que celles traitées. Ainsi de manière aléatoire, lors de certains passages, les cellules contrôles génèrent une plus grande quantité de sphères que les cellules sélectionnées par les drogues et inversement, ne permettant pas de conclure sur une différence significative du caractère d'auto-renouvellement entre ces deux populations. De plus, les cellules traitées possèdent une capacité moindre de clonogénicité comparé aux cellules non traitées. Comme discuté précédemment, ce résultat découle probablement de l'effet du traitement sur les cellules. Finalement, nous n'avons pas observé une augmentation de l'expression de MDR1, le taux de cette glycoprotéine restant stable après traitement par cytostatiques. Ces résultats ne permettent pas de conclure à un enrichissement en CSCs.

La complexité des mécanismes de résistance aux drogues du NB serait-elle le reflet de l'hétérogénéité cellulaire ?

La caractérisation de la population traitée n'ayant pas mis en évidence un enrichissement en cellules de type CSCs, nous supposons que son caractère résistant ne s'explique pas par la propriété de résistance accrue aux drogues des CSCs. Bien que la population traitée initialement ne détienne pas de propriétés de clonogénicité ni d'auto-renouvellement supérieures à la population non traitée, elle a acquis un caractère résistant aux drogues. Cette faculté est mise en évidence par la tendance des sphères qui dérivent des cellules de la lignée SK-N-Be(2)c exposées à la cisplatine à être plus résistantes aux diverses drogues que les sphères contrôles. Cette constatation s'observe de manière significative en présence de vincristine, quelle qu'en soit la concentration.

Le NB se distingue des autres tumeurs pédiatriques par sa grande hétérogénéité biologique. Toutefois, le rôle joué par cette caractéristique dans le comportement tumoral demeure complexe et en partie énigmatique malgré les recherches actuelles. Nous supposons que ce

caractère résistant est dû à l'existence de plusieurs sous-populations tumorales, conduisant à l'induction de mécanismes différents pour contrer les drogues et étant responsables d'une mauvaise réponse aux traitements anti-cancéreux. Une telle hétérogénéité cellulaire offre un avantage de survie aux cellules tumorales, malgré le recours à des drogues diverses qui possèdent de multiples mécanismes d'action. La propriété de résistance aux drogues ne serait donc pas exclusive aux CSCs. Cette hypothèse est appuyée par les résultats obtenus lors des tests de viabilité cellulaire effectués sur les lignées NB1-M5 et NB1-M5-NS. Ces derniers illustrent une résistance moindre de la lignée censée être enrichie en cellules de type CSCs.

Récemment, l'existence de sous-populations de CSCs a été mise en évidence au sein de glioblastomes et de tumeurs pancréatiques (34,35). La présence de plusieurs populations de cellules de type CSCs dans le NB pourrait également participer à l'explication des résultats discutés dans cette étude. Dans ce cas, la résistance aux drogues serait une caractéristique propre à un certain sous-type de CSCs et non pas la propriété de toutes les CSCs.

Bien que thérapeutiquement attrayante, l'hypothèse selon laquelle la résistance aux drogues serait uniquement due aux propriétés intrinsèques des CSCs est trop simpliste (10,36). Une multitude de mécanismes impliqués dans la résistance aux drogues coexistent vraisemblablement, source d'une grande complexité dans la régulation de la résistance et la nature des cellules souches cancéreuses.

PERSPECTIVES

Nous avons établi arbitrairement un LD à 80, afin d'obtenir une sélection cellulaire significative tout en conservant un nombre de cellules suffisant pour effectuer des tests fonctionnels et génotypiques. Ce LD n'est certainement pas assez restrictif pour mettre en évidence la sous-population faiblement représentée au sein du NB que constituent les CSCs, bien que certains auteurs évoquent un taux situé entre 4% et 37% de cellules s'apparentant aux CSCs dans une tumeur neuroblastique. Dès lors, un LD plus élevé offrirait une sélectivité plus grande, augmentant les chances de mettre en évidence des CSCs dans le NB.

Il serait opportun d'avoir une meilleure caractérisation des sphères traitées résistantes et des sphères non traitées, notamment leur taux d'expression du MDR1 ainsi que leur capacité clonogénique. De telles informations nous permettraient de mettre en évidence un potentiel enrichissement en cellules s'apparentant aux CSCs suite aux passages consécutifs des sphères. De plus, une meilleure connaissance du comportement ainsi que du profil d'expression génique des cellules dérivant des sphères traitées résistantes offrirait un outil important pour la compréhension des mécanismes de résistance aux drogues.

Dans cette étude, nous nous sommes uniquement intéressés au gène *mdr1*, que nous avons choisi au vu de sa probable implication au sein des CSCs. Or, il existe une multitude de gènes connus pour être incriminés dans les mécanismes de résistance. Hirschmann-Jax et al. ont mis en évidence, au sein des NBs, des cellules s'apparentant aux CSCs caractérisées par l'expression de protéines de transport nommées ABCG2 et ABCA3 (31). Ces dernières sont également impliquées dans le processus de résistance aux drogues. Newton et al. ont démontré une augmentation significative du taux d'ABCG2 dans des lignées cellulaires après une rechute tumorale par comparaison à des lignées cellulaires neuroblastiques prélevées au diagnostic. Cette même étude révèle une surexpression dans la population cellulaire après rechute tumorale de certains gènes tels que *nanog* et *pou5f1*, qui sont des régulateurs importants des cellules souches (32). Il serait pertinent d'observer le taux d'expression de ces gènes et protéines de transport au sein des populations cellulaires utilisées dans notre étude.

Finalement, deux des lignées cellulaires choisies pour cette étude sont depuis longtemps en culture *in vitro*, conditions sources de mutations modifiant leur génome initial. De ce fait, il faut rester prudent quant à l'interprétation des résultats obtenus sur ces deux lignées. Les lignées dérivant de NB1 proviennent directement de cellules d'une tumeur primaire. Il serait intéressant de comparer les résultats obtenus avec NB1 avec des résultats provenant d'autres lignées de tumeurs primaires.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cotran R, Kumar V, Collins T. Tumeurs et lésions pseudo-tumorales du nourisson et de l'enfant. in Robbins, Anatomie pathologique. Italie: Piccin Nuova Libreria; 2000. p. 586–94.
2. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *The Lancet*. 2007 juin;369(9579):2106–20.
3. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(3):203–16.
4. Pajic M, Norris MD, Cohn SL, Haber M. The role of the multidrug resistance-associated protein 1 gene in neuroblastoma biology and clinical outcome. *Cancer Lett*. 2005 oct 18;228(1-2):241–6.
5. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*. 2004 sept;23(43):7274–82.
6. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*. 2006 oct 1;66(19):9339–44.
7. Ross RA, Spengler BA. Human neuroblastoma stem cells. *Semin. Cancer Biol*. 2007 juin;17(3):241–7.
8. Coulon A, Flahaut M, Mühlethaler-Mottet A, Meier R, Liberman J, Balmas-Bourlout K, et al. Functional sphere profiling reveals the complexity of neuroblastoma tumor-initiating cell model. *Neoplasia*. 2011 oct;13(10):991–1004.
9. Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 mars;5(3):219–34.
10. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer*. 2005;5(4):275–84.
11. Lissauer T, Graham C. Neuroblastoma. in *Illustrated Textbook of Paediatrics*. Spain: Mosby Elsevier; 2007. p. 353–5.
12. Balwierz W, Wieczorek A. [New international staging system and classification of risk groups in neuroblastoma]. *Prz. Lek*. 2010;67(6):345–9.
13. Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, Haber M, Khan J, Nakagawara A, et al. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br. J. Cancer*. 2009 mai 5;100(9):1471–82.
14. Modak S, Cheung N-KV. Neuroblastoma: Therapeutic strategies for a clinical enigma. *Cancer Treat. Rev*. 2010 juin;36(4):307–17.
15. Coulon A, Flahaut M, Mühlethaler-Mottet A, Meier R, Liberman J, Balmas-Bourlout K, et al. Functional sphere profiling reveals the complexity of neuroblastoma tumor-initiating cell model. *Neoplasia*. 2011 oct;13(10):991–1004.

16. Hansford LM, McKee AE, Zhang L, George RE, Gerstle JT, Thorner PS, et al. Neuroblastoma cells isolated from bone marrow metastases contain a naturally enriched tumor-initiating cell. *Cancer research*. 2007;67(23):11234.
17. Scatena R, Bottoni P, Pontoglio A, Giardina B. The proteomics of cancer stem cells. Potential clinical applications for innovative research in oncology. *Proteomics. Clinical Applications*. 2011 sept 28
18. Scatena R, Bottoni P, Pontoglio A, Giardina B. Cancer stem cells: the development of new cancer therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*. 2011 juill;11(7):875–92.
19. Kim J, Orkin SH. Embryonic stem cell-specific signatures in cancer: insights into genomic regulatory networks and implications for medicine. *Genome Medicine*. 2011 nov 29;3(11):75.
20. Simon SM, Schindler M. Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(9):3497.
21. Wong CE, Paratore C, Dours-Zimmermann MT, Rochat A, Pietri T, Suter U, et al. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *J. Cell Biol*. 2006 déc 18;175(6):1005–15.
22. Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK, Guo W, Ferguson DO, Wu H, et al. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature*. 2006 mai 25;441(7092):475–82.
23. Smith KM, Datti A, Fujitani M, Grinshtein N, Zhang L, Morozova O, et al. Selective targeting of neuroblastoma tumour-initiating cells by compounds identified in stem cell-based small molecule screens. *EMBO Mol Med*. 2010 août;2(9):371–84.
24. Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res*. 1989 janv 1;49(1):219–25.
25. Ross RA, Spengler BA, Domènech C, Porubcin M, Rettig WJ, Biedler JL. Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells. *Cell Growth Differ*. 1995 avr;6(4):449–56.
26. Ross RA, Biedler JL, Spengler BA. A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer Lett*. 2003 juill 18;197(1-2):35–9.
27. Coulon A. Molecular and Functional Characterization of Neuroblastoma-Initiating Cells. université de Lausanne; 2011. 1-148.
28. Thiele C. Neuroblastoma. Dans: *Human Cell Culture*. Great Britain: Kluwer Academic Publishers; 1999. p. 21–53.
29. Flahaut M, Mühlethaler-Mottet A, Martinet D, Fattet S, Bourlout KB, Auderset K, et al. Molecular cytogenetic characterization of doxorubicin-resistant neuroblastoma cell lines: evidence that acquired multidrug resistance results from a unique large amplification of the 7q21 region. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006 mai;45(5):495–508.
30. Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*.

1977 juill 29;197(4302):461–3.

31. Goldstein LJ, Fojo AT, Ueda K, Crist W, Green A, Brodeur G, et al. Expression of the multidrug resistance, MDR1, gene in neuroblastomas. *J. Clin. Oncol.* 1990 janv;8(1):128–36.
32. Piccirillo SGM, Combi R, Cajola L, Patrizi A, Redaelli S, Bentivegna A, et al. Distinct pools of cancer stem-like cells coexist within human glioblastomas and display different tumorigenicity and independent genomic evolution. *Oncogene.* 2009 avr 16;28(15):1807–11.
33. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell.* 2007 sept 13;1(3):313–23.
34. Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest.* 2010 janv 4;120(1):41–50.
35. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, et al. A distinct « side population » of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004 sept 28;101(39):14228–33.
36. Newton TC, Wolcott K, Roberts SS. Comparison of the side populations in pretreatment and postrelapse neuroblastoma cell lines. *Transl Oncol.* 2010;3(4):246–51.