



Vendredi 9 septembre 2011
Journées scientifiques de l'AE2BM


Etude des mécanismes cellulaires et moléculaires
impliqués dans la différenciation et l'apoptose des
cellules de neuroblastome induites par du trioxyde
d'arsenic et de l'acide rétinoïque

**Alexandre Petit, Anthony Delaune,
Isabelle Dubus, Marc Vasse**

Laboratoire MERCI (EA 3829)

**UNIVERSITÉ
DEROUEN**

Le Neuroblastome

- Cancer solide le plus fréquent chez l'enfant (15% des cancers)
- Cellules dérivées des crêtes neurales bloquées dans un stade indifférencié
- Traitements conventionnels :
 - Chirurgie
 - Chimiothérapies (25 % de non répondeurs, effets délétères chez de jeunes enfants)
- Nouvelles visées thérapeutiques  Cibler spécifiquement les cellules tumorales
 - afin de les différencier (et donc arrêter leur prolifération),
 - et afin de limiter les effets secondaires des traitements

Différenciation des cellules de neuroblastome

➤ Acides rétinoïques :

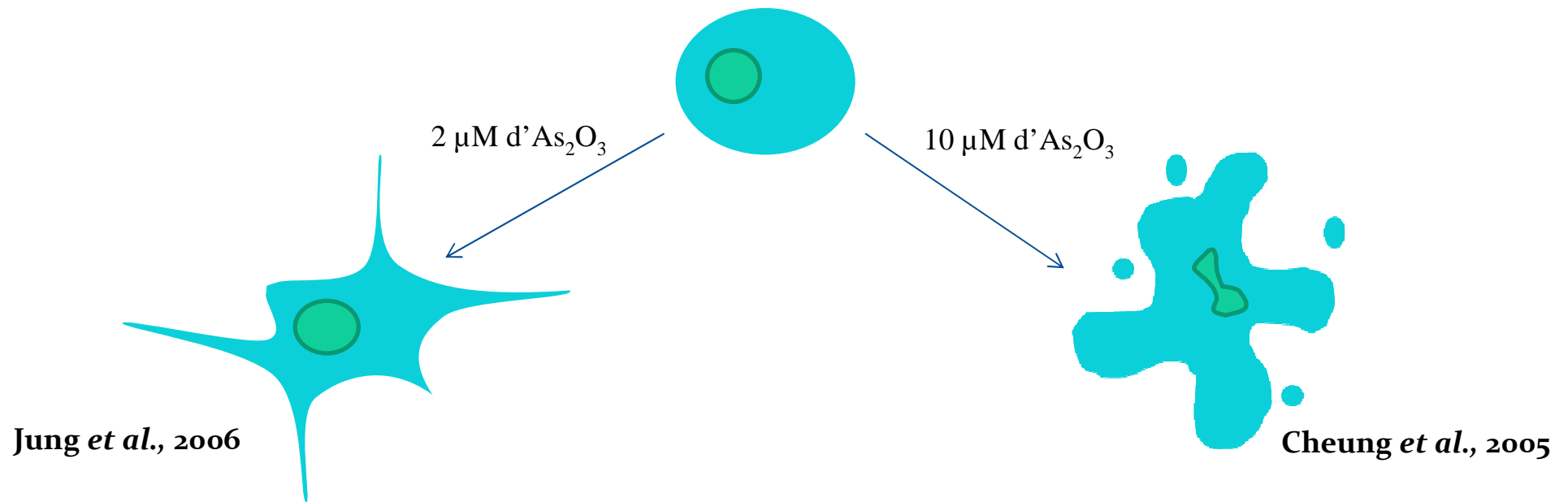
- Acide tout-*trans* rétinoïque (ATRA) :
 - Différenciation des cellules de neuroblastome *in vitro*
 - Implication de la voie ERK dans la différenciation induite par l'ATRA (Delaune *et al.*, 2008)
- Acide 13-*cis* rétinoïque : utilisé en traitement de consolidation pour les neuroblastomes de mauvais pronostic

➤ Inhibiteurs de PKC :

- H7 : 1 -(Sisoquinolinylsulfonyl)-2-methylpiperazine (Parodi *et al.*, 1990)
- Staurosporine (Jalava *et al.*, 1992)

Différenciation des cellules de neuroblastome

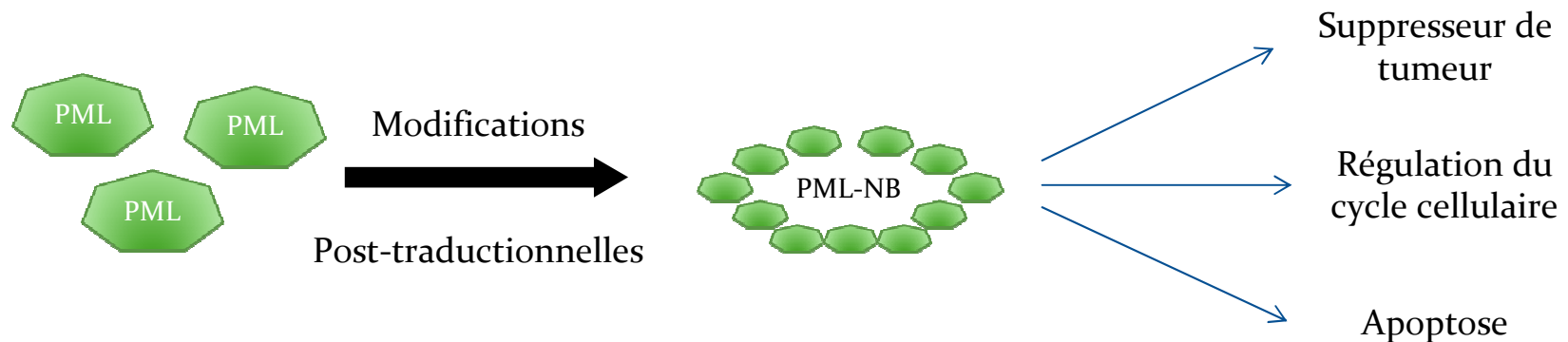
- Trioxyde d'arsenic (As_2O_3) : Effet dépendant de la dose



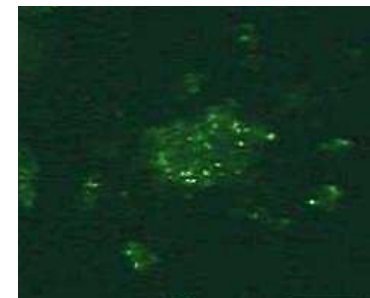
➔ Intérêt d'une association avec de l'ATRA ?

PML et corps nucléaires à PML

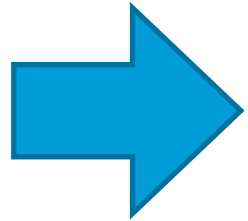
- Présence de corps nucléaires à PML (PML-NB) dans les cellules saines, absence dans les cellules de neuroblastome (Yu *et al.*, 2003)
- Modifications post-traductionnelles de PML (ProMyelocytic Leukemia)
➔ formation de PML-NB, recrutant de nombreuses protéines : p53, DAXX, pRB (Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2010)



- Traitement de cellules de neuroblastome par de l'ATRA :
 - Augmentation de l'expression de PML (Yu *et al.*, 2003)
 - Modifications post-traductionnelles de PML (Delaune *et al.*, 2008)
 - Formation précoce de PML-NB (Delaune *et al.*, 2008)



Objectifs du travail

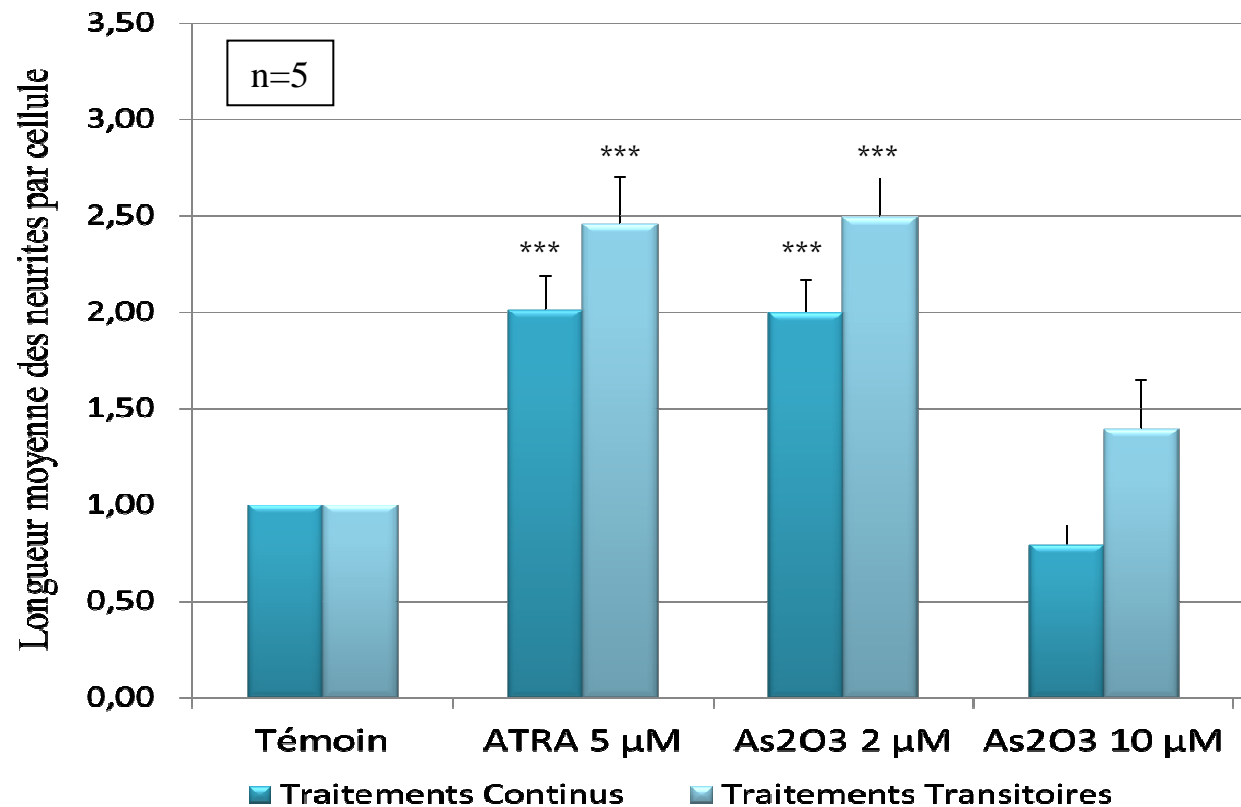


Etudier les mécanismes impliqués dans la différenciation et l'apoptose d'une lignée de neuroblastome (les SH-SY5Y), suite à un traitement par de l' As_2O_3

- Comparaison des effets de l' As_2O_3 et de l'ATRA sur la différenciation
- Implication de la voie ERK et des PML-NB dans la différenciation en réponse à l' As_2O_3 en comparaison à l'ATRA
- Implication des ROS dans la différenciation en réponse à l' As_2O_3 et à l'ATRA
- Implication de la voie ERK en réponse à un traitement pro-apoptotique par une forte concentration d' As_2O_3

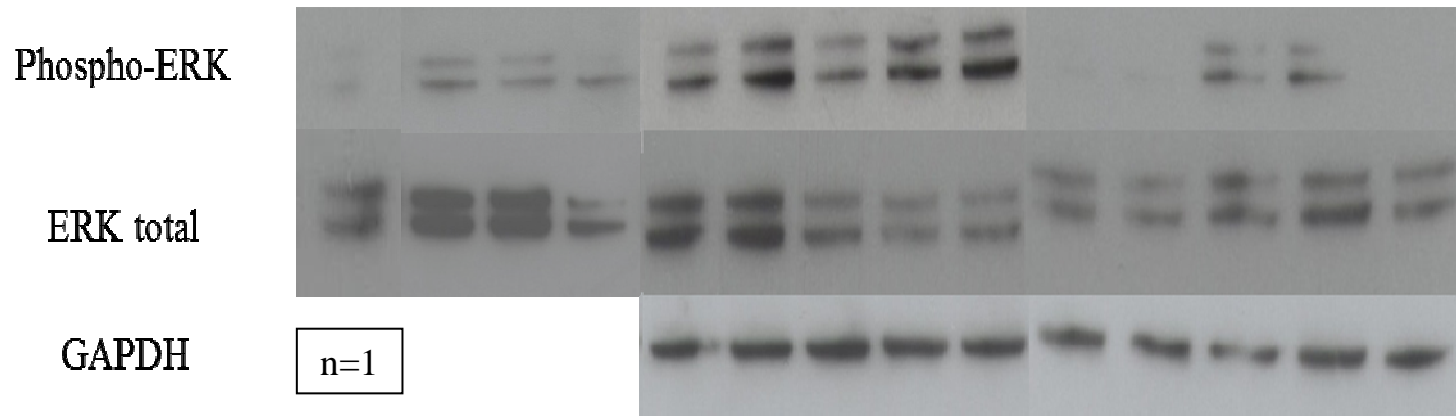
But de l'étude : Evaluer l'intérêt d'une association ATRA/ As_2O_3 , afin de limiter les effets secondaires

Effets de différents traitements sur la différenciation des SH-SY5Y



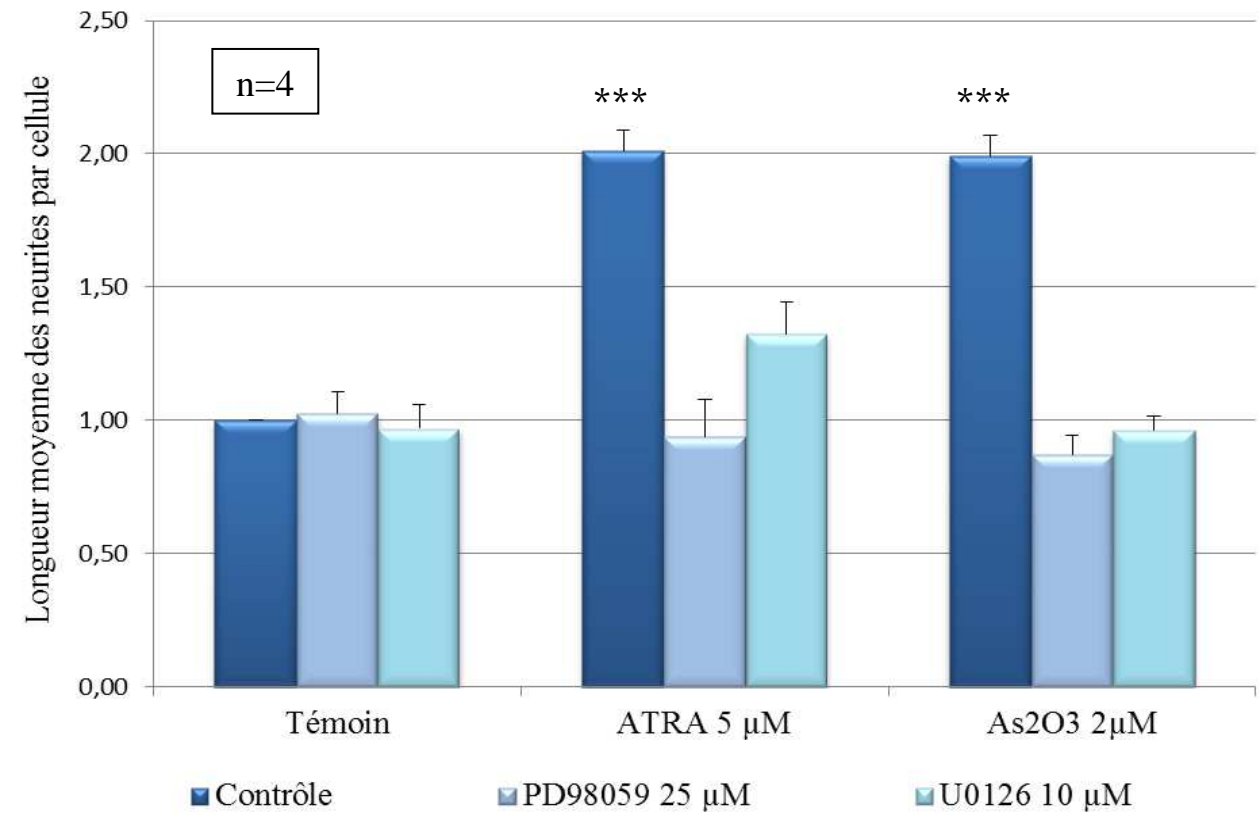
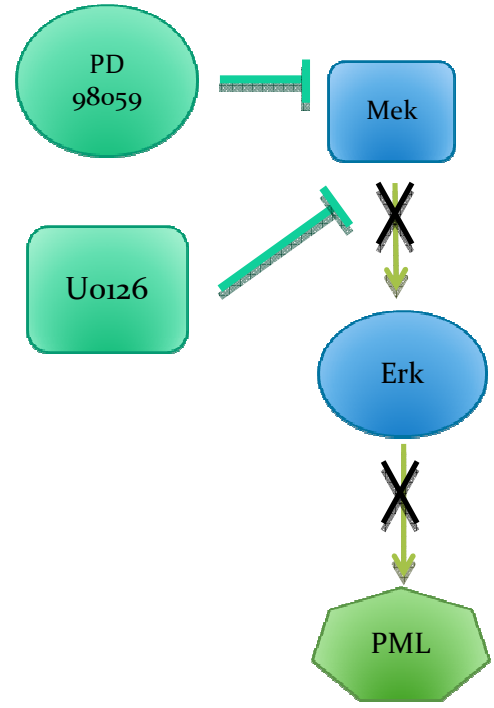
ATRA, As_2O_3 (2 μM) induisent la différenciation, aussi bien lors de traitements continus que de traitements transitoires

Implication de la voie Erk dans la différenciation des SH-SY5Y



As₂O₃ 2 μM	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
As₂O₃ 10 μM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
ATRA		+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Durée traitement		5	10	15	5	10	15	20	30	5	10	15	20	30

- Activation de la voie ERK lors de traitements par de l'ATRA ou de l'As₂O₃ (2 μM) à partir de 5 minutes d'incubation
- Activation de la voie ERK lors d'un traitement par une forte concentration d'As₂O₃ (10 μM) à partir de 15 minutes d'incubation

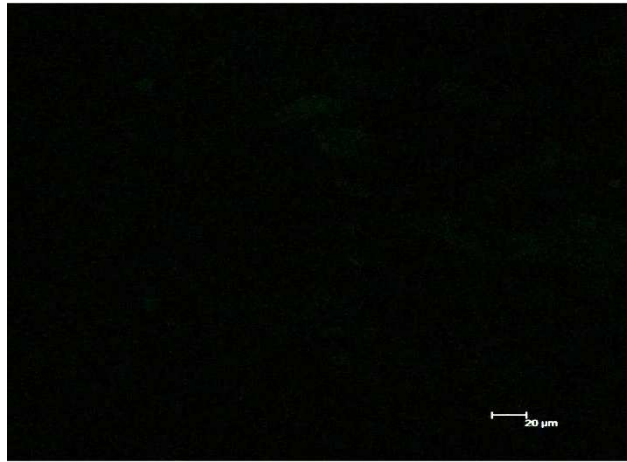


La voie ERK est impliquée dans la différenciation induite par l'ATRA et l'As₂O₃ (2 µM)

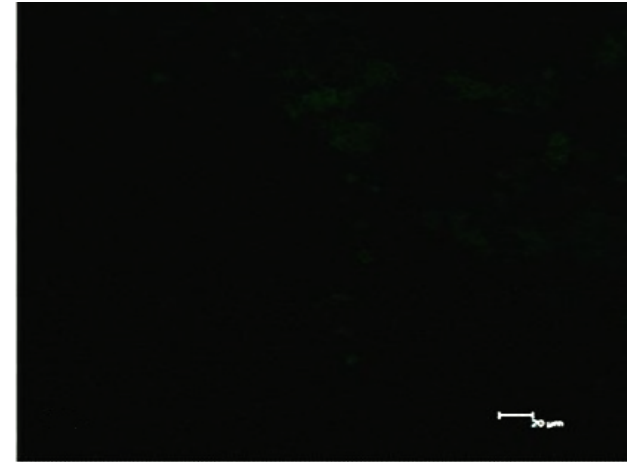
Formation des corps nucléaires à PML

- Immunomarquage de la protéine PML après 4h de traitements

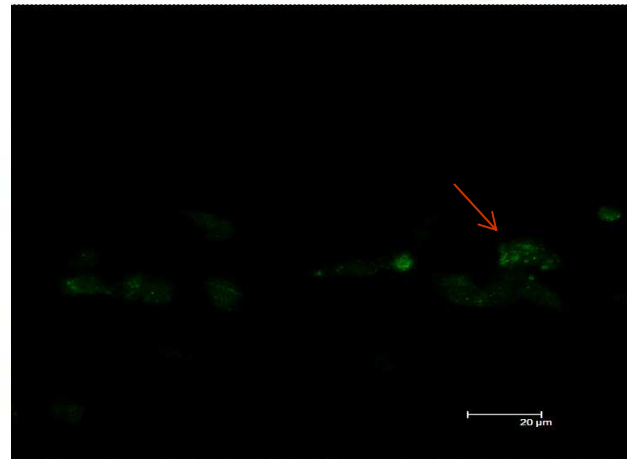
IgG1 contrôle



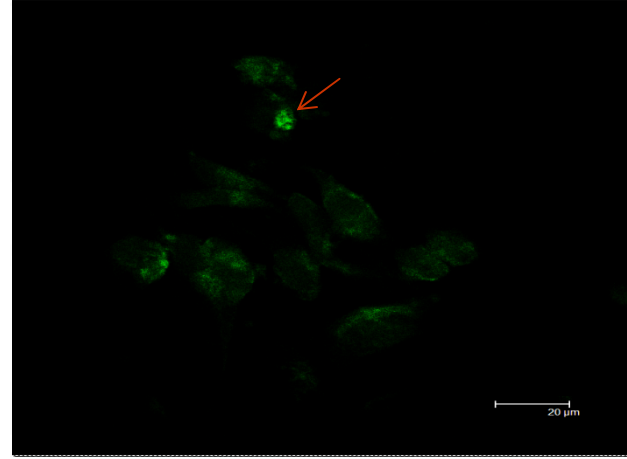
Témoin sans traitement



Trioxyde d'arsenic
2 μM

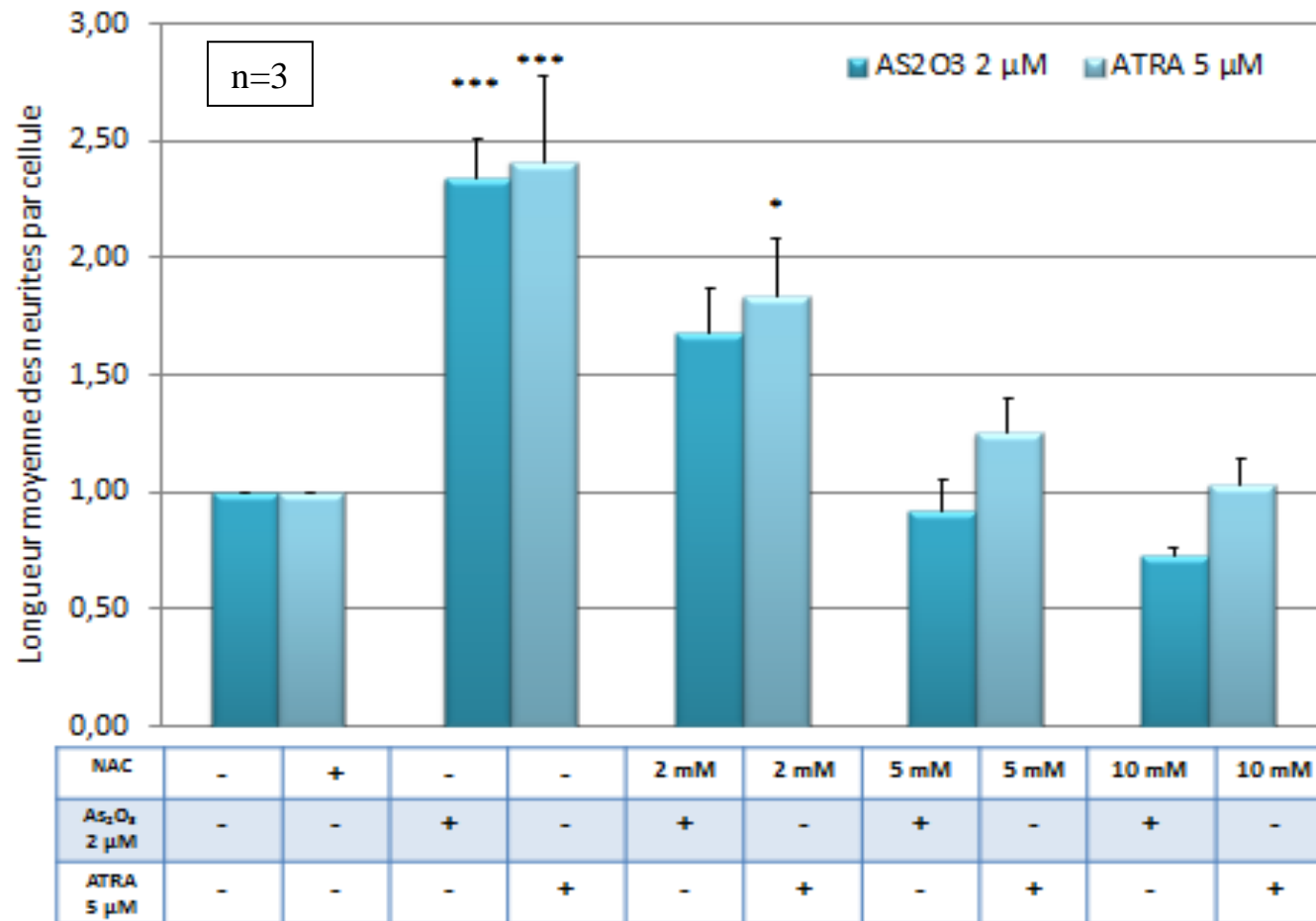


H7 15
μM



Formation de PML-NB après 4 heures de traitements par une concentration d'As₂O₃ induisant la différenciation

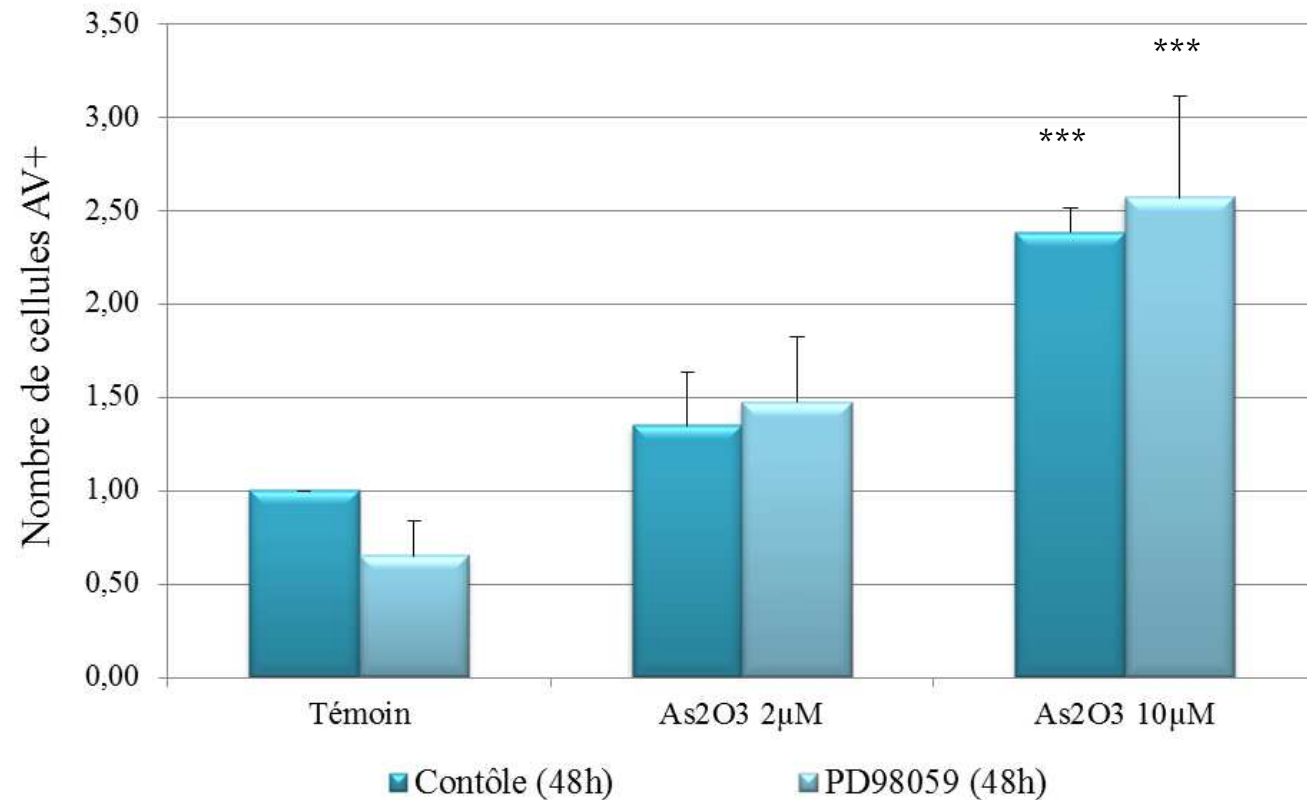
Implication des ROS dans la différenciation des SH-SY5Y



Les ROS sont impliquées dans la différenciation induite par l'ATRA ou l'As₂O₃ (2 μM)

Mécanisme impliqué dans l'apoptose des SH-SY5Y

Détection des phases précoces de l'apoptose par l'annexine V (n=3)



- Induction de l'apoptose lors d'un traitement par une forte concentration de trioxyde d'arsenic (10 μM)
- Mécanisme indépendant de la voie ERK

Etude du cycle cellulaire

Etude du cycle cellulaire par la technique de Vindelov (n=3)

* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ;
*** : p<0,001

Pourcentage de cellules	Phase Pré-G0	Phase G0/G1	Phase S	Phase G2/M
Témoin	1,8	74,1	11,6	12,5
As ₂ O ₃ 2 µM	4,6	56,6	15,6	23,2
As ₂ O ₃ 10 µM	9,7**	42,1**	20,4	27,8*
As ₂ O ₃ 2 µM + PD 98059	5,60	60,90	14,58	18,91
As ₂ O ₃ 10 µM + PD 98059	10,24***	45,20**	17,89	26,68*

- Induction de l'apoptose et d'un blocage en G2/M lors d'un traitement par une forte concentration de trioxyde d'arsenic (10 µM)
- Mécanisme indépendant de la voie ERK

Conclusions

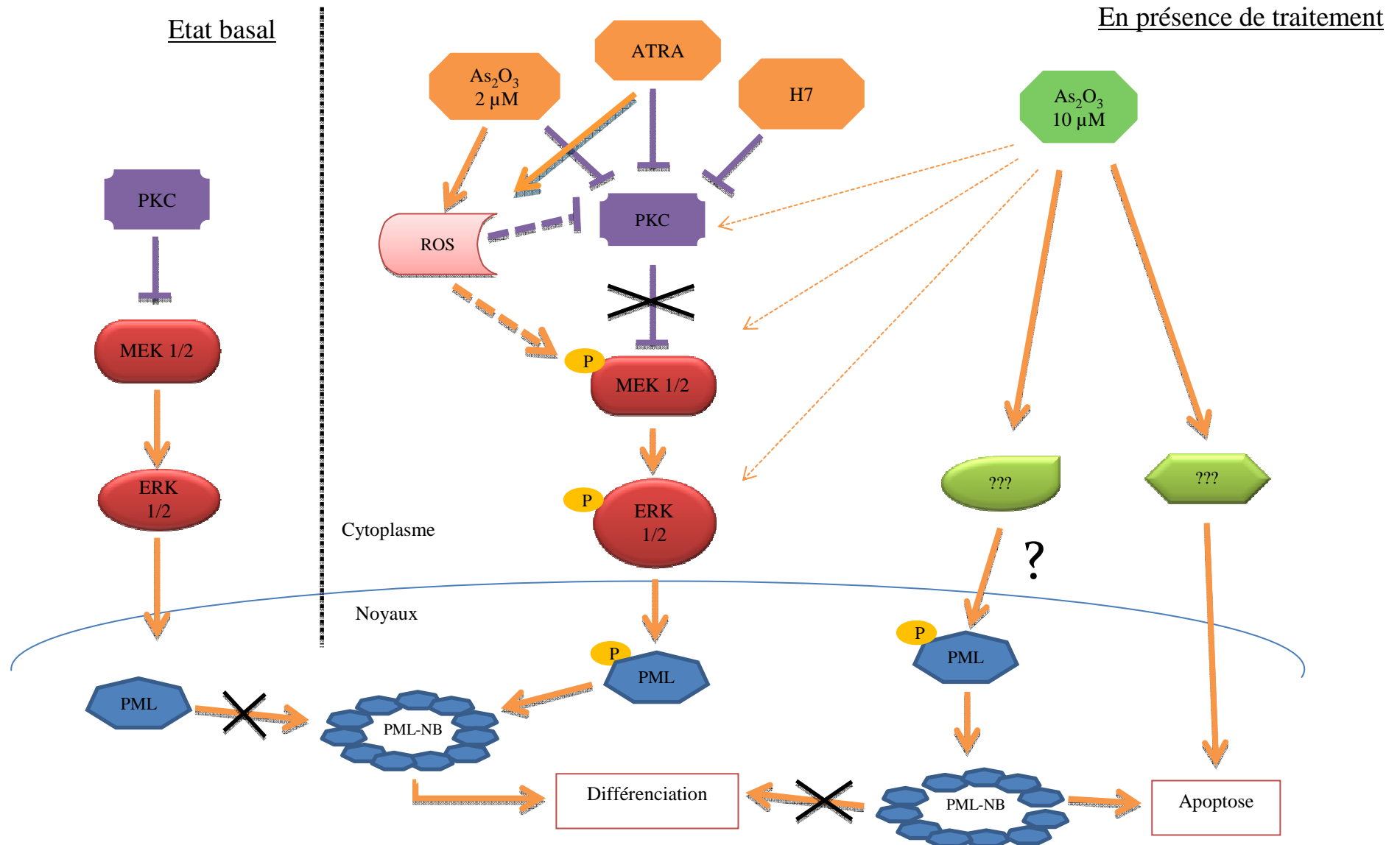
- Faible concentration d'As₂O₃ :
 - Différenciation des SH-SY5Y,
 - Implication de la voie ERK,
 - Implication des ROS,
 - Formation des PML-NB

 Les mécanismes semblent être les mêmes que pour l'ATRA

- Forte concentration d'As₂O₃ :
 - Induction de l'apoptose des SH-SY5Y,
 - Blocage du cycle cellulaire en G2/M

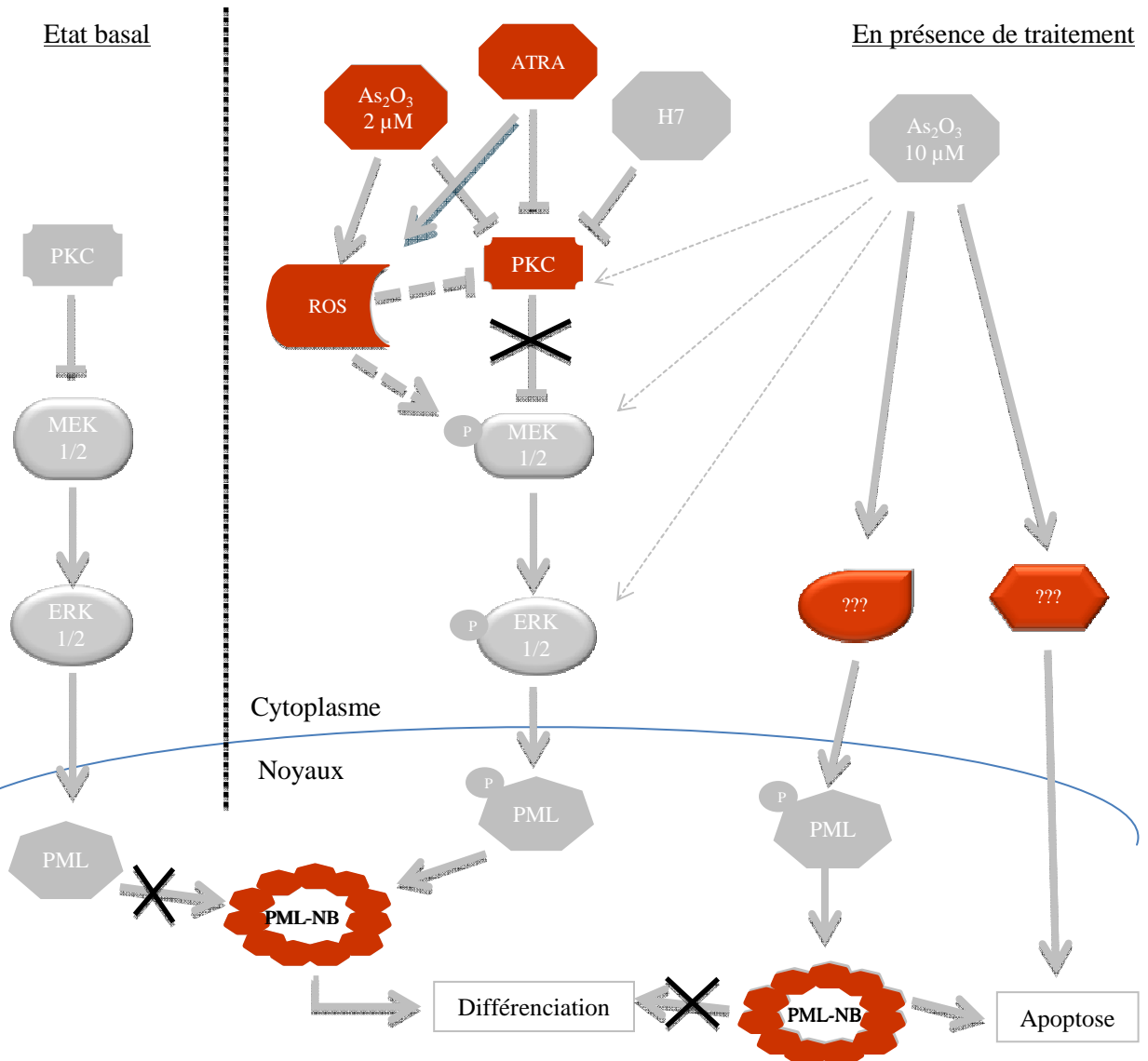
 Ces effets semblent indépendants de la voie ERK

Conclusions



Perspectives

- Confirmer les résultats obtenus sur d'autres lignées de neuroblastome, ainsi qu'avec d'autres marqueurs de différenciation
- Préciser le mode d'action des ROS et des PKC sur le mécanisme de différenciation et de formation des PML-NB
- Identifier les mécanismes impliqués ainsi que le rôle des PML-NB dans l'apoptose
- Evaluer l'efficacité de traitements combinés (As_2O_3 + ATRA)





Merci de votre attention