



FR9810206

Le rôle des métaux trace dans la prolifération des cellules de neuroblastome humain : relations avec l'oncogène N-myc

Ph. Moretto, C. Michelet (CENBG)

B. Gouget, R. Ortega, C. Sergeant, Y. Llabador, M. Simonoff (URA 451, Gradignan, France)

J. Bénard (Laboratoire de Pharmacologie Clinique et Moléculaire, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France)

Neuroblastoma is one of the most common tumors in young children. Iron is known to be necessary for cellular proliferation. Several studies have suggested that neuroblastoma cells appear to be relatively sensitive to growth inhibition by specific Fe chelators, *in vitro*. In addition, it appeared that an increased serum ferritin level at diagnosis was associated with a poorer outcome than a normal level. On the other hand, it was reported that untreated primary neuroblastoma had multiple copies of the N-myc oncogene. A significant association between genomic amplification and rapid tumor progression after diagnosis has been demonstrated. In order to study the relationship between iron and N-myc amplification, we propose to determine the trace metal content of neuroblastoma cells. Preliminary results obtained with two distinct cell lines: SK-N-SH, a neuroblastoma cell line with a single copy of N-myc and IGR-N-91, a metastatic cell line exhibiting 60 copies of N-myc are presented.

Les tumeurs de type neuroblastome posent actuellement un problème aigu en cancérologie puisqu'elles touchent le système nerveux chez l'enfant. Afin de préciser le rôle éventuel du fer et des autres métaux trace dans le développement des cellules malignes de type neuroblaste, notre équipe s'est associée avec le groupe du Dr Bénard de l'Institut G. Roussy à Villejuif, un laboratoire de pharmacologie étroitement lié au service de pédiatrie de cet Institut.

Le fer est un élément essentiel dans la prolifération cellulaire (1). En effet, les agents qui interagissent avec le métabolisme du fer inhibent cette prolifération. En particulier, l'effet antiprolifératif de la deferroxamine, un chélateur spécifique du fer, a été démontré *in vitro* sur un certain nombre de lignées cellulaires. Les cellules de neuroblastome sont relativement sensibles à cette inhibition de croissance (2). La ferritine, protéine de stockage du fer, est fabriquée en quantité anormale par les cellules de neuroblastome (3). Des teneurs particulièrement élevées de protéines liées au fer dans les tissus cancéreux ont été observées chez les patients aux stades les plus avancés de la maladie. Le taux de ferritine sérique est d'ailleurs considéré comme un élément de pronostic défavorable pour l'évolution des neuroblastomes chez l'enfant (4).

La prolifération cellulaire normale est régulée par des molécules de contrôle, dont les proto-oncogènes font partie. Ces proto-oncogènes ont habituellement un rôle stimulateur mais peuvent se transformer accidentellement en oncogène par un certain nombre de mécanismes, comme l'amplification. Le gène peut, en effet, être amplifié jusqu'à un nombre important de copies à la suite d'une répllication chromosomique anormale. Le proto-oncogène N-myc suit ce processus (5). Il code pour un facteur de transcription nucléaire, protéine de liaison à l'ADN pouvant initier un programme génétique menant à la prolifération cellulaire. Les neuroblastomes sont caractérisés par l'amplification de l'oncogène N-myc, surtout dans le cas des stades avancés (6). Enfin, des travaux ont déjà montré que l'expression de c-myc, oncogène apparenté à N-myc, et du gène des récepteurs de la transferrine, protéine de transport du fer, sont régulées de manière coordonnée (7).

Devant les évidences expérimentales énoncées précédemment, on peut avancer l'hypothèse suivante : Il semble exister une relation entre le taux de fer nucléaire des neuroblastes et leur activité proliférative dans le cadre des tumeurs de type neuroblastome. Comme l'oncogène N-myc est un gène essentiel à ces activités, peut-on mettre en évidence une corrélation entre ce taux de fer et l'expression de l'oncogène N-myc ? D'autres cations métalliques pourraient-ils jouer un rôle dans le dérèglement du contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaire ?

Nous nous appliquons à vérifier ces hypothèses en dosant par microanalyse nucléaire les métaux trace intracellulaires (Mn, Fe, Cu, Zn) sur deux lignées de neuroblastome humain. L'une, N-myc amplifiée (IGR-N-91) (8), a été récemment initiée à l'Institut Gustave Roussy (Villejuif). Elle présente soixante copies de l'oncogène N-myc. L'autre, non amplifiée (SK-N-SH) (9), initiée au Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (New York), sert de lignée de référence.

Au cours de l'année dernière, nous avons adapté les conditions de culture pour ces lignées et mis au point un protocole de fixation des échantillons. En effet, les cellules à analyser doivent non seulement adhérer mais aussi proliférer en monocouche sur un support compatible avec l'analyse nucléaire, un film de Formvar très mince (environ 200 nm). Les cellules sont ensuite cryofixées et lyophilisées afin de préserver l'intégrité des structures intracellulaires avant d'être introduites dans la chambre d'analyse, sous vide.

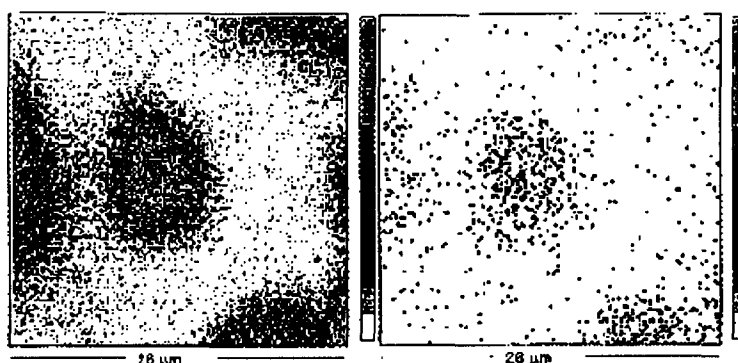
Ayant obtenu récemment des conditions de culture optimales des cellules sur le support, nous avons pu réaliser les premières analyses sur la microsonde du CENBG. Des résultats préliminaires relatifs à cette étude sont présentés dans le tableau 1: il s'agit de données quantitatives du dosage des éléments trace dans les cellules SK-N-SH et IGR-N-91. Chaque analyse (14 pour SK-N-SH et 15 pour IGR-N-91) porte sur un balayage large de la monocouche (environ 500x500 μm^2 , soit approximativement 2500 cellules).

Tableau 1 : Comparaison des concentrations en éléments trace dans les 2 lignées de neuroblastome étudiées

Concentration cellulaire $\mu\text{g/g}$ masse sèche	SK-N-SH ^a	IGR-N-91 ^b
Mn	9,3 \pm 3,0	6,1 \pm 2,2
Fe	145 \pm 53	49 \pm 11
Cu	12,7 \pm 6,4	18,1 \pm 11,5
Zn	226 \pm 55	206 \pm 44
Mn/Zn	0,041 \pm 0,007	0,030 \pm 0,008
Fe/Zn	0,653 \pm 0,212	0,238 \pm 0,019

^a n=14; ^b n=15

Figure 1: Distribution en carbone (gauche) et cuivre (droite) d'une cellule SK-N-SH. L'échelle de couleur correspond à des concentrations croissantes du blanc au jaune



Références :

1. Robbins E., Pederson T., Iron: its intracellular localization and possible role in cell division. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66,4 (1970) 1244-1251
2. Brodie C., Siriwardana G., Lucas J., Schleicher R., Terada N., Szepesi A., Gelfand E., Seligman P., Neuroblastoma sensitivity to growth inhibition by deferoxamine: evidence for a block in G1 phase of the cell cycle. Cancer Res. 53 (1993) 3968-3975
3. Iancu T.C., Shiloh H., Kedar A. Neuroblastomas contain iron-rich ferritin. Cancer 61(1988)2497-2502
4. Hann H.-W.L., Evans A.E., Siegel S.E., Wong K.Y., Sather H., Dalton A., Hammond D., Seeger R.C. Prognostic importance of serum ferritin in patients with stages III and IV neuroblastoma: the childrens cancer study group experience. Cancer Res. 45 (1985) 2843-2848
5. Schwab M. Amplification of N-myc in human neuroblastomas. Trends Genet. 1 (1985)271-275
6. Bénard J. Intérêt pronostique de l'oncogène N-myc dans le neuroblastome. Bulletin du Cancer 75(1988) 87-90
7. Barker K.A., Newberger P.E. Relationship between the cell cycle and the expression of c-myc and transferrin receptor genes during myeloid differentiation. Exp. Cell Research 186(1990)1-5
8. Ferrandis E., Da Silva J., Riou G., Bénard J. Coactivation of the MDR1 and MYCN genes in human neuroblastoma cells during the metastatic process in the nude mouse. Cancer Res. 54 (1994) 2256-2261
- Biedler J.L., Helson L., Spengler B.A., Morphology and growth, tumorigenicity and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. Cancer Res. 33 (1973) 2643-2652