

Gènes impliqués dans la dissémination métastatique et la réponse à la chimiothérapie du neuroblastome

Jean Bénard
Olivier Hartmann
Marie-José
Terrier-Lacombe
Chantal Bayle
Jean Lemerle
Guy Riou

Le neuroblastome est un cancer de l'enfant qui, lorsqu'il est métastatique d'emblée, a un très mauvais pronostic. Il est associé à de nombreuses altérations génétiques qui jouent un rôle déterminant dans le potentiel de dissémination métastatique : délétion du bras court du chromosome 1, amplification de l'oncogène N-MYC, absence d'expression du gène *CD44*. La mise au point de modèles expérimentaux de neuroblastome humain chez la souris athymique a permis de caractériser un ensemble d'anomalies génétiques spécifiquement associées au potentiel de dissémination : surexpression d'oncogènes, répression ou mutations de gènes suppresseurs de tumeurs, activation de gènes de résistance multiple aux médicaments (*MDR1* et *GST-π*) et activation de gènes antiapoptotiques. Ces anomalies génétiques des neuroblastomes métastatiques expliquent leur résistance à une chimiothérapie intensive, et permettent de proposer une nosologie de ces formes de cancer qui pourraient déboucher sur de nouvelles approches thérapeutiques spécifiques en clinique oncologique.

ADRESSES

J. Bénard : assistant, laboratoire de pharmacologie moléculaire. O. Hartmann : directeur de l'unité de transplantation médullaire. Département de pédiatrie. M.-J. Terrier-Lacombe : assistante. Département d'anatomie pathologique. C. Bayle : directrice du laboratoire d'hématologie. Département de biologie clinique. J. Lemerle : chef de service de pédiatrie. G. Riou : directeur du laboratoire de pharmacologie moléculaire. Institut Gustave Roussy, rue Camille-Desmoulins, 94805 Villejuif, France.

Le neuroblastome, tumeur solide du jeune enfant, manifeste une grande hétérogénéité génétique. Les travaux récents de cytogénétique et de biologie moléculaire ont révélé dans les tumeurs primitives des altérations génétiques fréquentes qui permettent de définir des profils génétiques distincts. Cette caractérisation moléculaire, qui s'avère utile pour traiter spécifique-

ment les formes localisées de la maladie, est actuellement en cours pour les formes métastatiques d'emblée chez l'enfant de plus d'un an. Nous développerons dans cette revue les principales avancées récemment rapportées dans ce domaine et qui concernent l'identification d'altérations génétiques spécifiquement associées aux neuroblastomes malins métastatiques, la création de modèles expérimentaux

RÉFÉRENCES

1. Hartmann O, Pein F, Caillaud JM, Bayle C, Couanet D, Gauthier F, Comoy E, Habrand JL. Neuroblastomes. *Cancers de l'enfant* (J. Lemerle). In: Hoerni B, Tubiana M, eds. *Encyclopédie des Cancers* 1989; 387-427.
2. Hartmann O, Pinkerton C, Philip T, Zucker JM, Breatnach F. Very high-dose cis-platinum and etoposide in children with untreated advanced neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1988; 6: 44-50.
3. Fong C, Dracopoli N, White P, Merrill P, Griffith R, Housman D, Brodeur G. Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastoma with *MYCN* amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3753-7.
4. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer K, Varmus H, Bishop J, Gelbert F, Brodeur G, Goldstein M, Trent J. Amplified DNA with limited homology to *myc* cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 1983; 305: 245-8.
5. Bourhis J, DeVathaire F, Wilson G, Hartmann O, Terrier-Lacombe MJ, Boccon-Gibod L, McNally N, Lemerle J, Riou G, Bénard J. Combined analysis of DNA ploidy index and *N-myc* genomic content in neuroblastoma. *Cancer Res* 1991; 51: 33-6.
6. Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda N, Azar C, Cantor A, Brodeur G. Association between high levels of expression of the *TRK* gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* 1993; 328: 847-54.
7. Versteeg R, Caron H, Cheng N, van der Drift P, Slater R, Wersterveld A, Voûte P, Delattre O, Laureys G, Van Roy N, Speleman F. *1p36* : every subband a suppressor ? *Eur J Cancer* 1995; 31A: 538-41.
8. Brodeur G. Molecular basis for heterogeneity in human neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 505-9.
9. Rubie H, Plantaz D, Michon J, Chastagner P, Coze C, Baranzelli MC, Avet-Loiseau H, Gauthier F, Bénard J, Delattre O, Combaret V, Hartmann O. Localized neuroblastoma : *N-myc* is the main prognostic factor and post-operative treatment can be deleted in infants. *SIOP XXVth Meeting Abstracts* 1993, p110, N° 582.
10. Bourhis J, Dominici C, McDowell H, Raschella G, Wilson G, Castello M, Plouvier E, Lemerle J, Riou G, Bénard J, Hartmann O. *N-myc* genomic content and DNA ploidy in stage-IVS neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1371-5.

pour la détection de ces anomalies génétiques et, enfin, le rôle des gènes impliqués dans la réponse du neuroblastome à la chimiothérapie. On peut espérer que l'identification d'altérations génétiques spécifiquement associées au potentiel métastatique permettra d'améliorer la thérapeutique de ces formes très agressives de la maladie.

Mise en évidence d'entités génétiques du neuroblastome

Le neuroblastome est une tumeur embryonnaire du système neuroectodermique spécifique de l'enfant. Cette tumeur solide siège au niveau cervical, thoracique et surtout abdominal et se développe aux dépens du système sympathique (chaîne ganglionnaire et médullosurrénale). Les neuroblastomes sont, avec les tumeurs cérébrales, les tumeurs solides les plus fréquentes de l'enfant de moins de cinq ans (incidence de 1 pour 7000 enfants). La classification de la maladie, fondée sur des critères cliniques (taille de la tumeur primitive, présence ou non de métastases d'emblée) permet de différencier les formes localisées de stade I, II, III, des formes métastatiques d'emblée, de stade IV, formes qui définissent deux maladies cliniquement différentes.

La dissémination métastatique qui caractérise les neuroblastomes de stade IV est révélée au diagnostic. Les métastases se développent à distance de la tumeur primitive, essentiellement dans les tissus ostéo-médullaires, parfois dans les ganglions à distance et dans le foie. On ne peut établir de relation entre la taille de la tumeur primitive et la présence de métastases. Ce sont les bilans d'extension médullaire, cytologiques et histologiques, ainsi que le bilan scintigraphique osseux qui révèlent les métastases (figure 1). Une forme métastatique spécifique du nourrisson, le stade IV-S, caractérisée par une tumeur primitive de petit volume et une dissémination cutanée, hépatique, quelquefois médullaire mais jamais osseuse, peut, dans certains cas, régresser spontanément de façon spectaculaire.

Le pronostic clinique dépend à la fois de l'âge (plus favorable s'il est infé-

rieur à un an, plus sévère s'il est supérieur à un an) et du stade clinique lors du diagnostic. Les neuroblastomes localisés sont traités essentiellement par chirurgie, ce qui permet une excellente survie. A l'inverse, le taux de survie est faible (30 % de survie à cinq ans) chez l'enfant de plus d'un an présentant un neuroblastome métastatique d'emblée (environ 50 % des neuroblastomes au diagnostic), à l'exception du stade IV-S. Une chimiothérapie agressive associée ou non à une autogreffe de moelle osseuse ne modifie pas ce pronostic [1, 2] (figure 2).

Le développement des techniques de cytogénétique, cytofluorimétrie et biologie moléculaire a permis d'identifier, à partir des tumeurs primitives de patients, des altérations génétiques spécifiques du neuroblastome (*m/s n°4, vol. 12, p. 527*). Ces altérations sont: (1) la perte d'hétérozygotie du bras court du chromosome 1 au niveau de la bande *1p36* [3]; (2) l'amplification de l'oncogène *N-MYC*, [4]; (3) la perte d'hétérozygotie du bras long du chromosome 14; (4) le réarrangement du bras long du chromosome 17; (5) une hyperdiploïdie, avec un contenu en ADN des cellules tumorales augmenté d'environ 50 % ou une diploïdie [5]; (6) une altération de l'expression ou de la fonction du récepteur du NGF (*nerve growth factor*) codé par l'oncogène *TRKA*. L'hyperdiploïdie et la surexpression de *TRKA* sont des facteurs de bon pronostic [6]. En revanche, la perte d'hétérozygotie en *1p36*, qui correspond à l'inactivation d'un ou de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs [7], et l'amplification de l'oncogène *N-MYC*, sont deux facteurs génétiques souvent associés et de mauvais pronostic [7, 8]: ils sont retrouvés essentiellement dans les neuroblastomes métastatiques d'emblée des enfants de plus d'un an. La combinaison de quatre de ces facteurs a permis de définir trois types génétiques distincts de neuroblastome [8] (Tableau I). Le type I présente une hyperdiploïdie et une surexpression de *TRKA*, sans autres altérations. Le type II correspond à un contenu en ADN diploïde avec une expression de *TRKA* faible et, parfois, une délétion modérée en *1p36*. Le type III est défini par un contenu en ADN diploïde, une perte

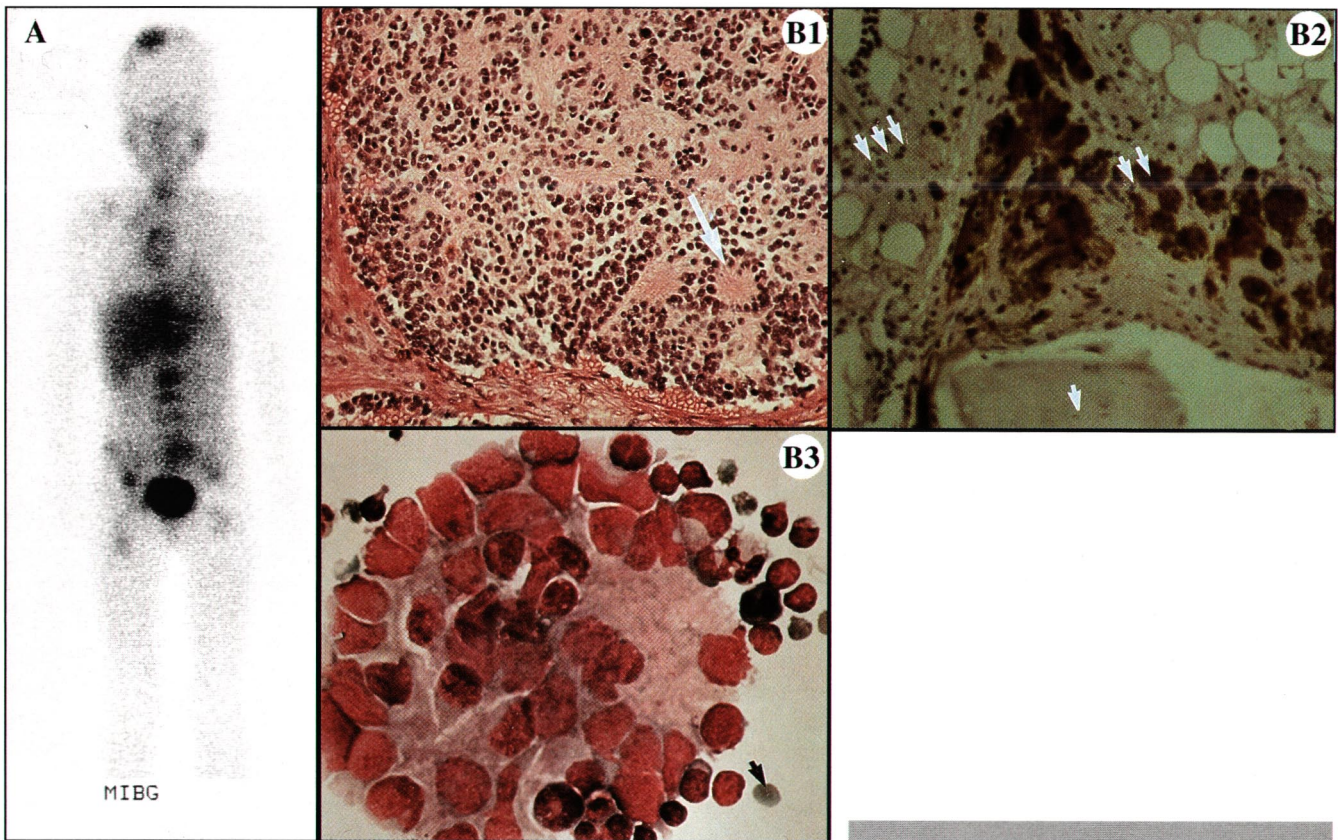


Figure 1. **Dissémination métastatique du neuroblastome.** **A. Scintigraphie osseuse à la mIBG d'un neuroblastome stade IV.** L'hyperfixation du marqueur radioactif (méta-iodo-benzy-guanidine, radiomarquée) se fait au niveau de la tumeur primitive (surrénale droite) et des métastases ostéo-médullaires (bassin, rachis et crâne). La faible fixation hépatique, cardiaque et thyroïdienne correspond au métabolisme normal du traceur. (Jean Lumbroso, Département Imagerie, IGR, Villejuif). **B. Aspects histologiques d'un neuroblastome métastatique.** **(B1) Tumeur primitive** constituée de neuroblastes s'agençant en rosettes (flèche) (coloration hématoxyline-éosine-safran, G × 150). **(B2) Métastases osseuses :** étude immunohistochimique indiquant une production importante d'énolase (NSE : neuron specific enolase) par les cellules tumorales infiltrant le tissu hématopoïétique (1 flèche, lamelle osseuse ; 2 flèches, envahissement tumoral NSE+ ; 3 flèches, tissu hématopoïétique restant). (G × 150). **(B3) Métastases médullaires de neuroblastome :** groupement caractéristique de cellules neuroblastiques, hématie (1 flèche) (coloration May Grunwald Giemsa, G × 700).

d'hétérozygotie dans la région 1p36, une amplification de N-MYC et une expression très faible de TRKA. Chaque type, respectivement associé à un pronostic bon, intermédiaire ou très mauvais, définit une entité nosologique distincte de la maladie. Il semble qu'il n'y ait pas de relation de filiation entre ces trois types, le passage d'un type de neuroblastome à un autre n'ayant encore jamais été mis en évidence.

Depuis 1989, des équipes de l'Institut Gustave Roussy (Villejuif), de l'Institut Curie (Paris) et du Centre Léon Bérard (Lyon), ont démontré l'intérêt potentiel de ces facteurs

génétiques pour la conduite du traitement du neuroblastome localisé. Sous l'égide de la *Société Française d'Oncologie Pédiatrique*, une étude portant sur plus de trois cents cas documentés de neuroblastomes localisés vient de confirmer la nécessité de prendre en compte, dès le diagnostic, l'amplification de N-MYC et le contenu en ADN des cellules tumorales [9]. Ainsi, un neuroblastome localisé présentant une hyperdiploïdie sans amplification de N-MYC sera traité uniquement par chirurgie alors qu'un neuroblastome localisé diploïde et avec une amplification de N-MYC bénéficiera d'un traitement

chirurgical suivi d'une chimiothérapie intensive. Le « mariage » de la biologie moléculaire à la clinique oncologique a pu trouver là l'une de ses premières applications en routine ! Si l'amplification de N-MYC et la diploïdie sont des facteurs de mauvais pronostic pour les neuroblastomes métastatiques de stade IV-S [10], ils ne sont pas assez discriminants pour les neuroblastomes de l'enfant âgé de plus d'un an. Pour les tumeurs diploïdes, en effet, le pronostic est identique en présence ou en absence d'amplification de N-MYC. Pour définir des entités nosologiques distinctes de ces formes agres-

RÉFÉRENCES

11. Boyer B, Jouanneau J, Tucker G, Vallès A, Sastre X, Moens G, Thiery JP. La métastase cancéreuse. *médecine/sciences* 1990; 6: 433-42.
12. Hata JI, Ueyama Y, Tamaoki N, Furukawa T, Morita K. Human neuroblastoma serially transplanted in nude mice and metastases. *Cancer* 1978; 42: 468-73.
13. Ferrandis E, Da Silva J, Riou G, Bénard J. Co-activation of the *MDR1* and *MYCN* genes in human neuroblastoma cells during the metastatic process in the nude mouse. *Cancer Res* 1994; 54: 2256-61.
14. Bettan-Renaud L, Bayle C, Teyssier JR, Bénard J. Stability of phenotypic and genotypic traits during the establishment of a human neuroblastoma cell line, IGR-N-835. *Int J Cancer* 1989; 44: 460-6.
15. Klein, G, Klein E. Evolution of tumours and the impact of molecular oncology. *Nature* 1985; 315: 190-5.
16. Holzman D. New genes crowd the horizon, create possibilities. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1108-10.
17. Brison O. Gene amplification and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1155: 25-41.
18. Caron P, Peter M, Van Sluis P, de Kraker J, Laureys G, Michon J, Brugières L, Voûte P, Westerveld A, Slater R, Delattre O, Versteeg R. Evidence for 2 tumour suppressor gene loci on chromosome 1p35-36 involved in neuroblastoma: one probably imprinted, another associated with *N-myc* amplification. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 535-9.
19. Schweigerer L, Breit S, Wenzel A, Tsumamoto K, Ludwig R, Schwab M. Augmented *MYCN* expression advances the malignant phenotype of human neuroblastoma cells: evidence for induction of autocrine growth activity. *Cancer Res* 1990; 50: 4411-6.
20. Schweigerer L, Fotsis T. Human neuroblastoma cells with enhanced *N-myc* expression: growth factors and growth inhibitors. In: Schwab M, Tonini GP, Bénard J eds. *Human Neuroblastoma: recent advances in clinical and genetic analysis*. Harwood Academic Publishers, 1993: 135-43.
21. Wenzel A, Cziepluch C, Hamann U, Schürmann J, Schwab M. The *N-myc* oncoprotein is associated *in vivo* with the phosphoprotein Max(p20/22) in human neuroblastoma cells. *EMBO J* 1991; 10: 3703-12.
22. Ayer D, Kretzner L, Eisenmann R. Mad: a heterodimer partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 1993; 72: 211-22.

	Type I	Type II	Type III
N-MYC ADN	normal	normal	amplifié
perte d'hétérozygotie 1p	hyperdiploïde	diploïde	diploïde
Expression de TRK-A	absente	rare	fréquente
Age habituel	élevée	variable	faible ou nulle
Stade habituel	moins de 1 an	plus de 1 an	1-5 ans
Survie à 3 ans	I, II, IV-S	III, IV	III, IV
	95 %	25-30 %	< 5 %

D'après G. Brodeur [8].

sives de la maladie, il faut donc rechercher d'autres facteurs génétiques, en particulier des altérations de gènes suppresseurs de tumeurs.

A la recherche de modèles expérimentaux

L'invasion tumorale et la dissémination métastatique des cancers par voie hématogène mettent en jeu des processus complexes à plusieurs étapes liées entre elles qui conduisent à l'angiogenèse, l'invasion des cellules tumorales, leur entrée dans les vaisseaux, leur transport par le sang, leur arrêt au niveau de l'endothélium vasculaire, leur sortie des vaisseaux et leur prolifération sur le site métastatique [11].

On connaît mal le phénomène de dissémination ostéo-médullaire du neuroblastome de stade IV (figure 1); la présence systématique de métastases lors du diagnostic, indépendante du volume de la tumeur primitive, en fait une maladie diffuse d'emblée. Le processus de dissémination du neuroblastome métastatique est différent de celui de nombreux adénocarcinomes métastatiques de l'adulte, du sein ou du côlon par exemple, dont la dissémination succède à la formation d'une tumeur primitive importante. Il existe donc deux maladies métastatiques distinctes, l'une qui caractérise la plupart des tumeurs solides et qui résulte d'une progression tumorale séquentielle d'un point de vue chronologique, et l'autre que l'on désigne par maladie diffuse d'emblée.

Les quelques cas de dissémination métastatique observés à partir de xénogreffe de neuroblastome humain chez la souris athymique [12] n'ont pas permis d'établir de modèle d'étude des neuroblastes malins métastatiques. C'est à partir des métastases médullaires d'un malade et de la tumeur primitive d'un autre

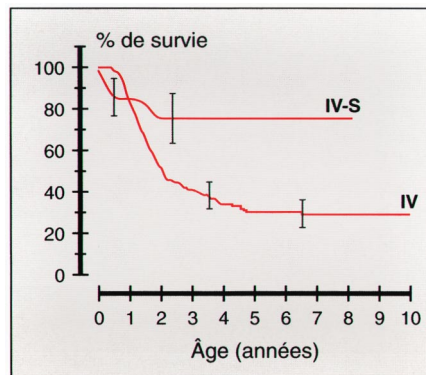


Figure 2. **Courbe de survie actuarielle des neuroblastomes métastatiques.** Courbe «IV»: survie sans événement des neuroblastomes métastatiques d'enfant de plus d'un an ayant bénéficié d'une chimiothérapie intensive suivie d'une autogreffe de moelle osseuse à l'Institut Gustave Roussy (n = 224). (Ellen Benhamou, Département Statistiques Médicales, IGR, Villejuif). Courbe «IV-S»: Survie sans événement de neuroblastomes IV-S (n = 34) traités à l'Institut Gustave Roussy [48].

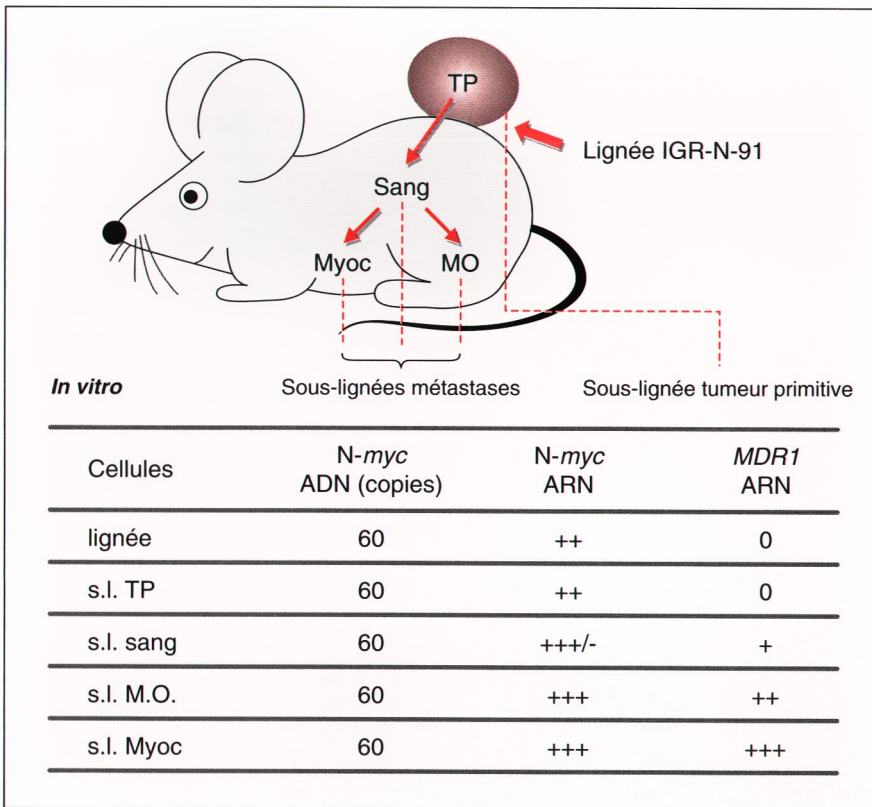


Figure 3. **Modèle de neuroblastomes humains disséminant chez la souris athymique.** La lignée (l) de neuroblastes malins IGR-N-91 établie *in vitro*, induit une tumeur « primitive » (TP) sous-cutanée à partir de laquelle des neuroblastes disséminent dans le myocarde (Myoc) et la moelle osseuse (MO) de la souris athymique. La tumeur primitive et les organes sont cultivés *in vitro* et les différentes sous-lignées (s.l.) sont désignées, respectivement, s.l. TP, s.l. Sang, s.l. Myoc, s.l. MO.

malade que deux lignées de neuroblastomes de stade IV ont été établies, respectivement appelées IGR-N-91 [13] et IGR-N-835 [14]. Après injection sous-cutanée à la souris athymique, les cellules IGR-N-91 forment localement des tumeurs hémorragiques très invasives et disséminantes: des métastases macroscopiques sont retrouvées dans les reins, les surrénales des animaux. En outre, des neuroblastes malins sont identifiés dans le sang, la moelle osseuse et le myocarde des souris, neuroblastes qui ont permis d'établir *in vitro* des sous-lignées [13]. La dissection et l'analyse de la tumeur primitive ont montré que le tissu hémorragique tumoral est à l'origine de la dissémination métastatique (Cappellen et Bénard, communication personnelle). Ces résultats ont été reproduits avec la lignée IGR-N-

835. Il apparaît que les deux modèles IGR-N-91 et IGR-N-835 utilisent, chez la souris athymique, des voies de dissémination lymphatique et hématogène, un envahissement médullaire étant par ailleurs systématiquement observé. En mimant la maladie métastatique de l'enfant (figure 3), ces deux modèles animaux constituent des outils de choix pour mieux comprendre les événements génétiques impliqués dans la dissémination métastatique du neuroblastome et définir les relations cellulaires existant entre neuroblastes malins et tissus hôtes. L'invasion et la dissémination des cellules tumorales s'accompagnent d'anomalies génétiques spécifiques qui modifient la croissance de la cellule cancéreuse et son comportement vis-à-vis de l'organisme. Ces anomalies concernent des onco-

gènes, des gènes suppresseurs de tumeurs mais aussi des gènes modulateurs [15] impliqués dans le contrôle de l'environnement des clones cellulaires tumoraux, dans les mécanismes de l'angiogenèse et de la dissémination métastatique, et dans le maintien de l'intégrité du génome [16].

Délétion du chromosome 1p, amplification de l'oncogène N-MYC et dissémination métastatique

A l'exception du type IV-S, le profil génétique des formes métastatiques du neuroblastome, est comparable au type III défini par Brodeur [8]; la perte d'hétérozygotie sur le bras court du chromosome 1 (1p) concerne la moitié des cas [3], et l'amplification de N-MYC, seulement un tiers des cas. La délétion du 1p intéresse toutes les tumeurs avec amplification de N-MYC, et l'association de l'activation d'un oncogène par amplification [17] et de l'inactivation d'un (des) gène(s) suppresseur(s) de tumeur est frappante [7]. Dans 15% des cas environ, une délétion du 1p est observée en l'absence d'amplification de N-MYC [7]. L'analyse de la perte d'hétérozygotie a permis de réaliser une cartographie fine du 1p entre les régions 1p35 et 1p36-3 et de définir, pour chaque type de tumeur, la zone délétée la plus faible en taille. Il s'avère que, pour les tumeurs avec amplification de N-MYC, la zone délétée est très large (1p35;1p36-3) et porte, de façon aléatoire, sur le matériel d'origine paternelle ou maternelle. Pour les tumeurs sans amplification de N-MYC, la zone délétée est plus petite et très distale (1p36-2-36-3), et intéresse exclusivement le matériel d'origine maternelle [18]. Ces résultats suggèrent l'existence de deux gènes suppresseurs en 1p35-36.3, dont l'un seulement est soumis à l'empreinte génomique parentale [7, 18]. L'existence d'une délétion du 1p dans la tumeur primitive présentant ou non une amplification de N-MYC, suggère que ces altérations ont été acquises avant la dissémination métastatique et confèrent aux neuroblastomes leur capacité d'envahir et de

RÉFÉRENCES

23. Bernards R. *N-myc* disrupts protein kinase C-mediated signal transduction in neuroblastoma. *EMBO J* 1991; 10: 1119-25.
24. Bogenmann E, Torres M, Matsushima H. Constitutive *N-myc* expression inhibits *trkA* mediated neuronal differentiation. *Oncogene* 1995; 10: 1915-25.
25. Galmiche A, Lustenberger P. CD44, invasion tumorale et métastase. *médecine/sciences* 1994; 10: 1282-91.
26. Shtilvelman E, Bishop JM. Expression of CD44 is repressed in neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 5446-53.
27. Favrot M, Combaret V, Lasset C. CD44-A new prognostic marker for neuroblastoma. *N Engl J Med* 1993; 329: 1965.
28. Lacombe M, Lascu I, Sastre-Garau X, Wallet V, Véron M. NDP kinases, développement et cancer: une action *via* des protéines liant le GTP? *médecine/sciences* 1992; 8: 449-54.
29. Hailat N, Keim D, Melhem R, Zhu X, Ackerskon C, Brodeur G, Reynolds C, Seeger R, Lottspeich F, Strahler J, Hanash S. High levels of p19/nm23 protein in neuroblastoma are associated with advanced stage disease and with *N-myc* amplification. *J Clin Invest* 1991; 88: 341-5.
30. Leone A, Seeger R, Hong C, Hu Y, Arboleda M, Brodeur G, Stram D, Slamon D, Steeg P. Evidence for *nm23* RNA overexpression, DNA amplification and mutation in aggressive childhood neuroblastomas. *Oncogene* 1993; 8: 855-65.
31. Chang C, Zhu X, Thoravai D, Ungar D, Rawvas J, Hora N, Strahler J, Hanash S, Radany E. *nm23-H1* mutation in neuroblastoma. *Nature* 1994; 370: 335-6.
32. Lepage P, Gros P. La glycoprotéine P: de la résistance croisée aux médicaments au transport des lipides biliaires. *médecine/sciences* 1995; 11: 357-66.
33. Bourhis J, Bénard J, Hartmann O, Boccon-Gibod L, Lemerle J, Riou G. Correlation of MDR1 gene expression with chemotherapy in neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1401-5.
34. Bénard J, Bourhis J, de Vathaire F, Ferrandis E, Terrier-Lacombe MJ, Lemerle J, Riou G, Hartmann O. Prognostic value of MDR1 gene expression in neuroblastoma: results of a multivariate analysis. In: Evans A, Biedler J, Brodeur G, D'Angio G, Nakagawara A, eds. *Advances in neuroblastoma research*. New York: Wiley-Liss, 1994: 111-6.
35. Ferrandis E, Babajko S, Bénard J. MYCN protein activates the MDR1 promoter in human neuroblasts. *Proc Am Ass Cancer Res* 1995; 36: (338 abstr n° 2010).

disséminer. Toutefois, leur existence dans la tumeur primitive ne permet pas de les considérer comme des facteurs discriminants du potentiel métastatique.

Le niveau d'expression de l'oncoprotéine N-Myc est un facteur de progression tumorale

L'amplification de *N-MYC*, dont la fréquence augmente avec le stade du neuroblastome, constitue un facteur de pronostic péjoratif pour les formes localisées. On peut s'appuyer sur cette observation et sur l'étude de lignées de neuroblastome humain pour dire que la quantité d'oncoprotéine synthétisée, proportionnelle (en première approximation) au degré d'amplification du gène [4], joue un rôle sans doute déterminant dans la tumorigenèse, mais aussi dans l'invasion et la dissémination métastatiques. En effet, la grande majorité des lignées humaines établies *in vitro* présentent une amplification de *N-MYC*. Après transfection du gène *N-MYC*, les neuroblastes de la lignée SH-EP-SH (qui normalement ne synthétisent pas l'oncogène) ont une croissance accrue *in vitro* et induisent la formation de tumeurs chez la souris athymique [19]; une importante activité protéolytique, caractéristique de l'invasion tumorale, est observée dans les cellules SH-EP-SH: la concentration d'un activateur du plasminogène de type urokinase augmente alors que l'inhibiteur correspondant est indétectable; en outre, dans les cellules transfectées, le mécanisme de l'angiogenèse est activé par l'action autocrine du FGF (*fibroblast growth factor*) sécrété [19]. Ces résultats ont été confirmés par l'étude du modèle de neuroblastome humain métastatique, IGR-N-91, qui exprime constitutivement l'oncoprotéine. Les neuroblastes IGR-N-91 cultivés *in vitro* à partir d'une xénogrefe sous-cutanée chez la souris, du sang, de la moelle et du myocarde des souris [13] (*figure 3*), s'ils possèdent tous dans leur génome un nombre important et constant de copies de *N-MYC* (60 copies/génome haploïde), présentent des niveaux de transcrit qui augmentent de manière significative lors de leur dissémina-

tion chez la souris athymique [13]; en effet, les neuroblastes métastatiques (provenant de la moelle et du myocarde) ont un taux de transcrit de l'oncogène environ double de celui de la tumeur primitive. Notre hypothèse est que l'augmentation de l'expression du gène *N-MYC* entraîne l'activation des gènes impliqués au plan biologique dans ce qu'il est convenu d'appeler « le super décathlon malin » pour décrire ainsi la voie complexe et à étapes multiples utilisée par les cellules métastatiques (invasion, adhérence, migration, etc.). En résumé, la concentration de l'oncoprotéine, qu'elle résulte d'une transfection ou d'une expression constitutive dans des neuroblastes malins, est corrélée à l'angiogenèse et au potentiel métastatique. Localisée dans le noyau, phosphorylée par la caséine kinase II, la protéine *N-Myc*, dont la demi-vie est courte, présente dans sa partie carboxy-terminale des motifs structuraux communs à d'autres oncoprotéines-facteurs de transcription comme *c-Jun* et *c-Fos*: une région basique de fixation à l'ADN, un domaine hélice-boucle-hélice permettant une interaction protéine-protéine, et un motif à glissière de leucines (*leucine zipper*). *In vivo*, dans les neuroblastes malins humains, *N-Myc*, incapable de s'homodimériser, s'associe à la phosphoprotéine Max dont la demi-vie est longue [21]: l'hétérodimère formé *N-Myc-Max*, capable de se lier à l'ADN sur la séquence consensus CACGTG, transactive certains gènes encore inconnus. Max, à l'inverse, est capable de s'homodimériser et le dimère Max-Max, en se fixant sur la région consensus, réprime l'activité transcriptionnelle de *N-Myc*. Dans ce contexte, Max étant en excès par rapport à *N-Myc* (M. Schwab, communication personnelle), c'est la concentration de *N-Myc* qui conditionnerait l'activité transcriptionnelle de l'oncoprotéine. Il existe, cependant, une autre protéine partenaire, désignée Mad, qui ne forme ni homodimères ni hétérodimères *Mad-Myc*; en revanche, formant des hétérodimères *Mad-Max*, elle réprime alors l'activité transcriptionnelle de *N-Myc* [22]. L'activité de facteur de transcription de *N-Myc* dépend ainsi entièrement des autres parte-

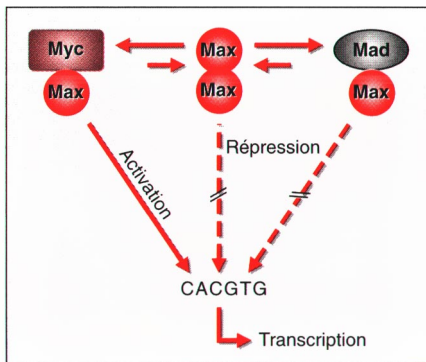


Figure 4. **Régulation de l'activité transcriptionnelle de N-MYC dans le neuroblastome. Implication des protéines partenaires.** On pense que l'homodimère Max-Max et l'hétérodimère Mad-Max agissent comme des répresseurs alors que l'hétérodimère N-Myc-Max est un activateur transcriptionnel de gènes cibles contenant la séquence consensus CACGTG dans leurs promoteurs. Dans les neuroblastes dans lesquels N-MYC est surexprimé, la formation d'hétérodimères N-Myc-Max est favorisée. L'existence d'homodimères Max-Max et de complexes Mad-Max n'a pas encore été mise en évidence dans les neuroblastes malins. D'après [22].

naires protéiques (figure 4). Les modèles expérimentaux décrits ci-dessus représentent actuellement des modèles de choix pour analyser l'influence des variations de concentration de N-Myc, Max et Mad sur les processus d'invasion et de dissémination métastatiques. Ainsi, l'analyse de la protéine N-Myc dans des lignées de neuroblastome a permis d'attribuer à cette oncoprotéine non seulement un rôle d'activateur transcriptionnel de gènes impliqués dans la prolifération et la dissémination métastatique mais aussi un rôle de perturbateur de la voie de transduction. Par exemple, les neuroblastes transfectés par N-MYC n'induisent plus l'ARN messager de *c-fos* ni la synthèse du facteur transcriptionnel NFκB sous l'action de l'ester de phorbol, activateur de la protéine kinase C; l'induction est restaurée lorsque la protéine kinase C est introduite dans les neuroblastes transfectés par N-MYC [23]. Les auteurs ont montré que la transfection du gène N-MYC

dans une lignée de neuroblastome murin au potentiel métastatique, B104, provoque la suppression de l'isoforme δ de la protéine kinase C et l'induction de son isoforme ζ [23], inefficace dans cette voie de transduction. D'autre part, dans cette lignée et les sous-lignées transfectées par l'oncogène, l'expression constitutive de N-MYC inhibe la différenciation neuronale relayée par le récepteur du NGF, produit du gène *TRKA* [24]. En conclusion, il apparaît qu'une expression constitutive de N-MYC inhibe la sortie du cycle cellulaire et bloque la différenciation neuronale [24].

Expression des gènes CD44, NM23 et neuroblastome métastatique

L'intégrine humaine CD44, glycoprotéine membranaire, est impliquée en tant que récepteur de l'acide hyaluronique, dans la domiciliation lymphocytaire T et B et dans l'adhérence à la matrice extracellulaire. Le gène unique exprime une protéine standard (CD44H) et des formes variantes résultant d'un épissage alternatif et d'une modification post-traductionnelle, créant ainsi une famille hétérogène de protéines. Récemment, les isoformes CD44 ont été impliquées dans la formation de métastases (pour une revue générale voir [25]). La forme standard de CD44 accroît les propriétés tumorigènes de mélanomes alors qu'une forme variante particulière, CD44v6, est synthétisée lors de la dissémination métastatique de nombreuses tumeurs humaines solides. La surproduction de CD44v6 est ainsi considérée comme un facteur de mauvais pronostic pour les cancers du côlon, de l'estomac et du sein [25].

A l'inverse, dans le neuroblastome, la dissémination métastatique n'est pas associée à la synthèse d'isoformes variantes ou de CD44 standard. Un travail initial avait même rapporté que l'expression de *CD44* était faible ou nulle dans des lignées établies *in vitro* [26], allant jusqu'à suggérer que la répression du gène pourrait être un marqueur d'agressivité. Ce résultat a été confirmé en analysant des tumeurs de neuroblastome par immunohistochimie ou

hybridation sur réplique d'ARN. L'isoforme standard est synthétisée normalement dans 100 % des stades I, II et III, dans le stade IVS et dans les ganglioneuromes mais exceptionnellement dans les tumeurs de stade IV. Quel que soit le type de neuroblastome, les isoformes variantes ne sont pas produites. Dans le neuroblastome métastatique, en revanche, la répression du gène codant pour CD44 est considérée comme un marqueur d'agressivité. Une étude multivariée a confirmé ces résultats en établissant que l'expression de *CD44* était un facteur indépendant de bon pronostic [27]. Il s'agit maintenant de comprendre le rôle joué par l'isoforme standard dans la pathogénie du neuroblastome.

Le gène *NM23*, suppresseur de métastases, existe sous deux formes, *H1* et *H2*, codant, respectivement, pour les nucléotides diphosphokinases A et B, protéines homologues impliquées très probablement dans la prolifération, le développement cellulaire, et l'apoptose [28]. Alors que l'expression du gène *NM23* est inversement associée au potentiel métastatique dans un grand nombre de cancers humains (sein, mélanome, cancer colique héréditaire), la situation est plus complexe dans le neuroblastome: les formes avancées (stades III et IV) présentent des quantités élevées de transcrits du gène *NM23 H1* avec une amplification du gène pour environ le tiers d'entre elles, associée à un mauvais pronostic [29]. Des études de conformation de l'ADN simple brin et le séquençage direct des parties 5' et 3' traduites des gènes *H1* et *H2* ont révélé plusieurs altérations: une substitution Leu⁴⁸ → Val, dans la partie amino-terminale de la protéine NM23 [30]. Un travail récent a mis en évidence, dans la partie codante du gène *NM23H1*, une substitution Ser¹²⁰ → Gly, substitution intéressant 6 des 28 tumeurs de stades III et IV analysées [31] mais que nous n'avons pas retrouvée dans les tumeurs avancées d'une série de 35 tumeurs primitives de neuroblastomes (A. Catteau *et al.*, communication personnelle). Les quelques mutations du gène *NM23* décrites à ce jour, pourraient rendre compte du dysfonctionnement de ce gène suppresseur de métastases dans

RÉFÉRENCES

36. Moscow J, Fairchild C, Madden M, Ransom D, Wieand H, O'Brien E, Poplack D, Cossmann J, Wyers C, Cowan K. The expression of anionic glutathione-S-transferase and P-glycoprotein genes in human tissues and tumors. *Cancer Res* 1989; 49: 1422-8.
37. Lowe S, Ruley H, Jacks T, Housman D. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents *Cell* 1993; 74: 957-67.
38. Solary E, Bertrand R, Pommier Y. Le rôle de l'apoptose dans la genèse des cancers. *médecine/sciences* 1993; 9: 127-75.
39. Fisher D. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 1994; 78: 539-42.
40. Vogan K, Bernstein M, Leclerc J, Brisson L, Brossard J, Brodeur G, Pelletier J, Gros P. Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastoma. *Cancer Res* 1993; 53: 5269-76.
41. Davidoff A, Pence J, Shorter N, Iglehart J, Marks J. Expression of p53 in human neuroblastoma and neuroepithelioma derived cells lines. *Oncogene* 1992; 7: 127-33.
42. Moll U, Riou G, Levine A. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7262-6.
43. Moll U, La Quaglia M, Bénard J, Riou G. Wild-type p53 protein undergoes nuclear exclusion in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4407-11.
44. Goldman S, Chen C, Kastan M. Localization and function of p53 in human neuroblastoma. *Proc Am Ass Cancer Res* 1995; 36: 610 (abstr n° 3631).
45. Hanada M, Krajewski S, Tanaka S, Cazals-Hatem D, Spengler B, Ross R, Biedler J, Reed J. Regulation of *bcl-2* oncoprotein levels with differentiation of human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1993; 53: 4978-86.
46. Hanania N, Boyano MD, Mangin C, Poupon MF. Oncogene and *MDR1* gene expression in rat rhabdomyosarcoma sublines of different metastatic potential. *Anticancer Res* 1991; 11: 473-80.
47. Kerbel R, Kobayashi H, Graham C. Intrinsic or acquired drug resistance and metastasis: are they linked phenotypes? *J Cell Biochem* 1994; 56: 37-47.
48. Suarez A, Hartmann O, Vassal G, Giron A, Habrand JL, Valteau D, Brugières L, Khalifa C, Lemerle J. Treatment of stage IV-S neuroblastoma: a study of 34 cases treated between 1982 and 1987. *Med Pediatr Oncol* 1991; 19: 473-7.

le neuroblastome, indépendamment d'une réduction de son expression.

Hyperexprimés, les gènes de détoxification MDR1 et GST- π sont des marqueurs de la chimiorésistance des neuroblastes métastatiques

Les cellules métastatiques étant les cibles essentielles de la chimiothérapie, une résistance à ce type de traitement pourrait résulter d'altérations génétiques responsables d'un phénotype de chimiorésistance. Dans sa forme métastatique de l'enfant de plus d'un an, le neuroblastome se comporte très fréquemment comme une tumeur chimiosensible mais non chimio-curable ([1], *figure 2*): les premières cures de chimiothérapie diminuent le volume de la tumeur primitive et font disparaître les métastases mais souvent la maladie métastatique réapparaît et échappe à tout traitement. Parmi les médicaments utilisés dans la chimiothérapie de première intention précédant la chirurgie figurent l'adriamycine, la vincristine et le VP16, molécules capables de sélectionner ou d'induire un phénotype de résistance multiple aux médicaments (*multidrug resistance*) (*MDR*). Dans les tumeurs humaines, ce phénotype *MDR* est très souvent associé à la présence d'une glycoprotéine membranaire de 170 kDa, la P-glycoprotéine (PgP) codée par le gène *MDR1*. Dans les cellules cancéreuses, la PgP fonctionne comme une pompe rejetant hors de la cellule de nombreux agents hydrophobes utilisés en chimiothérapie [32]. Cette protéine peut également être impliquée dans la détoxification cellulaire et la sécrétion d'hormones par la médullosurrénale, tissu d'origine d'un grand nombre de neuroblastomes. Ces deux éléments nous ont conduits à étudier l'expression du gène *MDR1* dans les neuroblastomes. Une étude préliminaire indique que le gène *MDR1* est plus fréquemment activé dans les formes métastatiques que dans les formes localisées [33]. Au terme de l'analyse d'une série d'échantillons tumoraux de 84 malades et d'une analyse multivariée, incluant les facteurs cliniques et bio-

logiques reconnus de la maladie, la surexpression du gène *MDR1* est apparue significativement associée à un risque élevé de mortalité [34], résultats confirmés par l'équipe de Victor Ling à Toronto (Canada). Dans notre série, une sous-population de neuroblastomes métastatiques, très agressifs et réfractaires à la chimiothérapie, présentait aussi une amplification de l'oncogène *N-MYC*. La question posée était de déterminer si la surexpression du gène *MDR1* résultait du traitement lui-même, de la progression tumorale, ou de la dissémination métastatique associée à l'expression de l'oncoprotéine *N-MYC*. Pour y répondre, nous avons utilisé le modèle IGR-N-91 dans lequel l'expression constitutive de *N-MYC* des neuroblastes malins métastatiques est supérieure à celle de la tumeur primitive. Dans ce modèle, une augmentation significative des transcrits du gène *MDR1* et de la concentration de PgP active est observée lors de la dissémination (*figure 3*), alors que la lignée dérivant de la tumeur primitive n'exprime pas le gène *MDR1* [13]: les neuroblastes circulants ayant métastasé dans la moelle et dans le cœur expriment le gène de manière croissante et graduée; l'ARNm code pour une PgP fonctionnelle, comme en attestent les mesures de cytotoxicité de l'adriamycine en présence et en l'absence d'inhibiteur de la PgP. Ainsi, l'oncogène *N-MYC* et le gène spécifique de résistance *MDR1* sont activés simultanément durant le processus métastatique, et cela en l'absence de toute chimiothérapie. Cette co-activation génique suggère que la protéine *N-Myc* active la transcription du gène *MDR1*, hypothèse qui a pu être confirmée par des expériences réalisées *in vitro* [35]. L'oncoprotéine serait ainsi capable d'activer la transcription d'un gène spécifiquement responsable d'un phénotype de résistance à la chimiothérapie. Le gène *MDR1* n'est pas le seul déterminant potentiel de la chimiorésistance du neuroblastome. En réponse à l'effet cytotoxique de médicaments tels que le cisplatine et le cyclophosphamide, utilisés dans le traitement de ce cancer, les neuroblastes malins mobilisent un méca-

nisme de détoxification cytoplasmique impliquant le glutathion et les glutathion-S-transférases. En accord avec l'activation fréquente de la glutathion-S-transférase (GST π) dans les tumeurs humaines [36], nous avons détecté une augmentation de l'expression de ce gène dans les neuroblastomes et prouvé qu'elle n'était pas un indicateur de mauvaise réponse à la chimiothérapie. En revanche, la surexpression combinée des gènes GST π et MDR1 apparaît significativement liée à une mauvaise réponse de la tumeur primitive à la chimiothérapie, relation qui reste à démontrer dans les métastases des patients. Les résultats obtenus avec le modèle IGR-N-91 suggèrent que donc que l'activation concomitante de la transcription de ces gènes soit nécessaire à l'installation du phénotype MDR dans les neuroblastes métastatiques.

Les expressions respectives des gènes N-MYC, BCL-2 et P53 et la réponse des neuroblastomes à la chimiothérapie

Les études récentes sur l'apoptose et en particulier l'action inductible de certains médicaments anticancéreux ([37], pour une revue générale [38]) ont conduit à réviser nos conceptions relatives aux mécanismes de la cytotoxicité des médicaments. Celle-ci dépendrait de la formation d'un complexe molécule cible, de la dégradation des cibles (ADN, ARN, protéines) mais aussi de l'activation de l'apoptose. En outre, la nature du cancer apparaît également comme un élément déterminant dans la réponse à la chimiothérapie. Les tumeurs testiculaires et certains cancers pédiatriques (leucémie, lymphomes, tumeurs de Wilms) fondent et guérissent de façon spectaculaire, à l'inverse des cancers pulmonaires, colorectaux et cérébraux, à très faible curabilité [39]. Cette grande hétérogénéité de réponse des cancers à la chimiothérapie pourrait refléter une aptitude différente de chaque type tumoral à engager les cellules vers l'apoptose.

Les données récentes obtenues sur des modèles cellulaires – essentiellement murins – désignent les gènes

P53 [37, 39], c-MYC et BCL-2 [38] comme les acteurs-clés du contrôle génétique de ces processus: l'expression respective de ces gènes orienterait la cellule vers la pause réparatrice, la prolifération ou l'apoptose [38]. Dans le cas du neuroblastome, le gène P53 est actuellement le mieux connu. Si les mutations du gène P53 sont très rares dans les tumeurs de neuroblastomes [40], on observe une surexpression du gène dans des neuroblastes immatures établis en culture [41]. Ainsi beaucoup d'auteurs ont conclu à la non-implication du gène P53 dans l'étiologie et la progression du neuroblastome. On peut néanmoins émettre l'hypothèse que, dans ce cancer, la p53 serait inactivée par un autre mécanisme, impliquant la participation de protéines capables de la séquestrer, au niveau nucléaire comme la protéine nucléaire Mdm2, ou au niveau cytoplasmique comme cela a été démontré dans le cancer du sein [42]. En collaboration avec Ute Moll de Stony Brook à New York, nous venons de montrer qu'en l'absence d'amplification du gène MDM2, la plupart des tumeurs indifférenciées de neuroblastome présentent une augmentation de la concentration de la protéine p53 dans le cytoplasme [43], ces données suggérant un défaut dans le transport de la p53 du cytoplasme vers le noyau. Qu'il s'agisse d'un mécanisme de séquestration (par quelle protéine?), ou d'une modification de la p53, l'exclusion nucléaire conduirait à la perte de fonction de la protéine. Il vient d'être rapporté que l'irradiation de neuroblastes cultivés *in vitro* et présentant une p53 cytoplasmique, fait apparaître, dans le noyau, une p53 fonctionnelle [44]. Ces données pourraient conduire au développement d'une thérapeutique combinée et séquentielle chimiothérapie-radiothérapie du neuroblastome métastatique. En ce qui concerne l'implication de l'oncoprotéine Bcl-2 dans la pathogénie du neuroblastome, des travaux réalisés sur des lignées indiquent que le gène de la protéine cytoprotectrice est surexprimé dans les neuroblastes immatures et non exprimé dans les cellules différenciées [45]. Paradoxalement, la participation de l'oncoprotéine N-Myc à l'apoptose reste mal connue. Aussi, afin d'éva-

luer l'implication de ces gènes dans le processus apoptotique et la réponse des neuroblastes malins à une chimiothérapie, le statut des gènes P53, BCL2 et N-MYC dans les modèles expérimentaux « tumeur-métastases » est en cours d'étude dans notre laboratoire.

Perspectives

Nos connaissances sur les altérations génétiques impliquées dans les processus métastatiques du neuroblastome sont très limitées. Sans données physiopathologiques sur la dissémination métastatique, il est difficile de déterminer si des anomalies génomiques importantes portant sur les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs, représentent des événements antérieurs ou postérieurs à la dissémination. En revanche des altérations de structure et d'expression des gènes « modulateurs » tels CD44 et NM23 semblent être plus spécifiquement associées au processus métastatique. On peut espérer que les modèles expérimentaux de neuroblastome humain permettront de préciser ces données.

Chez les patients dont la tumeur présente une amplification de N-MYC, comme dans le modèle expérimental de neuroblaste humain IGR-N-91, l'accroissement de l'expression de l'oncogène N-MYC est un facteur de stimulation de l'angiogenèse et de l'invasion, de la dissémination métastatique et de l'expression d'un phénotype de chimiorésistance. Si cette activation oncogénique n'intéresse qu'un nombre limité des neuroblastomes métastatiques (1/4 environ), elle doit être néanmoins rapprochée d'observations antérieures relatives au rhabdomyosarcome métastatique du rat [46] où c-JUN, c-FOS et c-MYC, gènes codant pour des protéines oncogéniques qui jouent aussi un rôle de facteur transcriptionnel, sont activés en parallèle avec le gène MDR1 et contrôlent l'expression du potentiel métastatique de ces modèles tumoraux. Ainsi, apparaît un lien direct entre la dissémination métastatique et la résistance aux médicaments anticancéreux [47]. A la lumière des données présentées dans cette revue, on peut suggérer que les niveaux de synthèse d'onco-

protéine(s) et protéine(s) suppressive(s) contrôlant le cycle cellulaire et l'apoptose déterminent les processus de dissémination métastatique et de chimiorésistance des neuroblastomes. Une connaissance plus fine de la régulation de ces protéines nucléaires pourrait conduire à une classification génétiques des neuroblastomes métastatiques et permettre des approches thérapeutiques différentes de celles de la chimiothérapie conventionnelle ■

TIRÉS À PART

J. Bénard.

Summary

Genes involved in metastatic dissemination and response to chemotherapy in neuroblastoma

Several genetic defects found in neuroblastoma are associated with the poor prognosis of this childhood cancer: deletion of the short arm of chromosome 1, N-MYC amplification and the absence of CD44 gene expression. However, evidencing these anomalies in initially metastatic primary neuroblastoma did not allow for improving the treatment of this aggressive form of the disease with a low survival. Alterations specifically associated with the potential for metastatic dissemination have thus been

sought for, in an attempt to classify metastatic neuroblastoma. In an experimental model of metastatic human neuroblastoma in athymic mice, N-MYC overexpression was demonstrated to be a marker of metastatic dissemination. Moreover, an increase in the rate of the oncoprotein in metastatic neuroblasts was found to be associated with genes responsible for the MDR phenotype (*MDR1*, *GST-π*). The combined activity of N-Myc, Bcl-2 and wild type p53 sequestered in the cytoplasm seems to promote an antiapoptotic mechanism. These anomalies could explain the often observed resistance to intensive chemotherapy and should lead to the promotion of new treatments for metastatic neuroblastoma.