

Bourse « Amélie la vie »

Compte rendu des travaux réalisés dans le cadre du Projet de Recherche :

Expression des protéines de résistance multiple aux médicaments au niveau des épendymomes et des tumeurs plexuelles de l'enfant.

Coordinateurs : Michelle Fèvre Montange, Jean François Gherzi-Egea

Travaux réalisés à l'Unité INSERM U842 (Directeur Pr J. Honnorat), en collaboration avec le laboratoire de Neuropathologie de l'Hôpital Neurologique, et la plateforme de génomique fonctionnelle de l'Institut Fédératif des Neurosciences de Lyon.

Rappel du programme et de ses objectifs

Les épendymomes et les tumeurs plexuelles sont des tumeurs du cerveau dont l'incidence est élevée chez l'enfant. Ces tumeurs prennent leur origine au niveau respectivement de l'épendyme qui tapisse la paroi des ventricules cérébraux et de l'épithélium choroïdien qui forme l'enveloppe des plexus choroïdes et sécrète le liquide céphalorachidien (LCR). L'efficacité des traitements pharmacologiques n'est pas démontrée pour ces tumeurs, et la résistance au traitement implique probablement des protéines dites "de résistance multiple aux médicaments", ces dernières empêchant les médicaments anticancéreux de pénétrer dans les cellules qui les expriment.

De nombreux travaux font état de la localisation physiologique de ces protéines de résistance multiple aux médicaments au sein des interfaces entre le sang, le LCR et le tissu cérébral. Ces interfaces, qui protègent le cerveau des molécules toxiques circulant dans le sang, sont localisées au niveau des microvaisseaux du cerveau (barrière hémocéphalique), mais également au niveau de l'épithélium choroïdien (barrière sang-LCR). L'épendyme, qui est à l'interface entre le parenchyme cérébral et LCR, semble également impliqué dans la protection du cerveau.

La connaissance de l'expression et de la fonctionnalité des protéines de résistance aux médicaments au sein du tissu choroïdien et épendymaire normal et tumoral reste très parcellaire, alors que c'est un élément clé de la compréhension de la chimiorésistance des tumeurs dérivées de ces assises cellulaires.

Nous projet de recherche a pour but, d'établir la cartographie de trois importantes protéines de résistances aux médicament, la Pgp, la MRP1 et la BCRP, au sein des épithéliums du cerveau normal, puis d'analyser i) le niveau d'expression global de ces protéines dans les épendymomes et les tumeurs plexuelles de l'enfant, et ii) leur

localisation cellulaire au sein des tumeurs, en établissant spécifiquement leur répartition entre les vaisseaux formant la barrière sang-tumeur, et les cellules du tissu tumoral proprement dit.

Le rôle fonctionnel de la BCRP dans la résistance multiple aux médicaments des tumeurs cérébrales est méconnu. Afin de comprendre comment la BCRP peut influencer sur les concentrations des médicaments anticancéreux au sein du LCR et des tumeurs dérivées de l'épendyme et de l'épithélium choroïdien, **nous tentons également de caractériser le mécanisme de transport transépithélial lié à la protéine BCRP.**

Travaux réalisés ou en cours de réalisation

1. Obtention du matériel biologique :

Nous avons réuni à ce jour les différents fragments tumoraux et tissu de sujets témoins suivants:

- 4 épendymomes intracérébraux de patients de grade II
- 4 épendymomes intracérébraux de patients de grade III
- 4 tumeurs plexuelles (3 papillomes de grade I et 1 carcinome de grade III)
- tissus de 3 sujets témoins (plexus choroïdes, cortex, parenchyme cérébral incluant de l'épendyme).
- En parallèle avec ces prélèvements d'origine humaine, des tissus de cerveau de rat ont été également microdisséqués.

Les échantillons tissulaires d'origine humaine proviennent de la banque Neurobiotec. Ces fragments tumoraux ont été stockés avec le consentement du malade. Chaque fragment d'épendymome a été divisé en deux parties, l'une réservée à l'étude moléculaire (recherche des ARN codant pour les protéines de résistance multiple aux médicaments), l'autre réservée à l'étude immunohistochimique (recherche de la localisation de ces protéines à l'aide d'un anticorps spécifique).

Pour chaque patient, les données cliniques ont été recueillies : l'âge, le sexe, l'histoire clinique, la date d'intervention, la qualité de l'exérèse chirurgicale, l'existence d'une récurrence. Le diagnostic anatomopathologique a été confirmé par la relecture des tumeurs par 2 neuropathologistes.

2. Etude de l'expression des transcrits de *Pgp*, de *MRP1* et de *BCRP*

L'extraction des ARN totaux a été réalisée pour l'ensemble des fragments tumoraux ; la mise au point de l'analyse en RT-PCR en temps réel des transcrits de *Pgp*, *MRP1* et *BCRP* a permis d'évaluer l'expression relative de ces trois gènes au sein des différentes tumeurs.

Les transcrits des trois gènes sont retrouvés dans les tumeurs plexuelles ainsi que dans les épendymomes, mais à des taux d'expression faibles. Aucune différence significative

d'expression au sein des épendymomes en fonction du grade n'a pu être mise en évidence, sur la base de notre nombre limité des tumeurs que nous avons analysé.

3. Etude de la localisation cellulaire de ces 3 protéines par immunofluorescence

Trois anticorps, C219, A23, et BXP-21 ont été utilisés pour localiser respectivement la Pgp, MRP1 et BCRP, dans le tissu sain et dans les épendymomes. La faible quantité de prélèvement de tissus tumoral d'origine choroïdienne n'a pas permis de réaliser d'études immunohistochimiques en parallèle des études moléculaires.

Les résultats marquants sont les suivants :

- Nous avons mis en évidence chez l'animal sain et chez l'homme témoin une spécificité de localisation forte de la Pgp et de la MRP1, respectivement dans les capillaires formant la barrière hémocéphalique et dans les plexus choroïdes formant la barrière sang-LCR.

Nos études préliminaires chez l'homme suggèrent la présence de cette protéine au niveau des vaisseaux cérébraux ainsi qu'au niveau du pôle apical de l'épithélium choroïdien et du pôle basolatéral de l'épendyme. Des expérimentations complémentaires sont en cours de réalisation.

- Nous avons montré qu'au sein des épendymomes, une immunoréactivité forte de la Pgp et de la BCRP est présente dans des structures cellulaires spécifiques et très localisées. Une étude de co-localisation avec un marqueur spécifique des cellules endothéliales, le facteur de von Willebrand, montre que ces structures auxquelles sont associées ces deux protéines sont les vaisseaux tumoraux. De plus, dans deux tumeurs épendymaires de l'enfant jeune, des cellules non endothéliales sont également positives pour BCRP. Elles semblent regroupées en "foyers". Des analyses de double marquages sont en cours pour identifier ces cellules, qui pourraient être des cellules souches tumorales.

- Contrairement à la Pgp et à la BCRP, la MRP1 n'est pas spécifiquement localisée au niveau des vaisseaux tumoraux. L'immunohistochimie n'a pas permis de conclure quant à sa localisation cellulaire précise au sein des tumeurs.

4. Etude fonctionnelle du transporteur BCRP

Un modèle cellulaire (rongeur) de l'interface sang-LCR reproduisant les propriétés des cellules épithéliales *in vivo*, et permettant les études de transport d'efflux et d'influx transcellulaire est utilisé. Des résultats préliminaires montrent que ces cellules expriment le transcrit à protéine BCRP. La mitoxantrone, une substance anticancéreuse qui est un substrat spécifique de BCRP est utilisée comme molécule modèle pour tenter de mettre en évidence l'activité fonctionnelle de la protéine.

Des études de toxicité cellulaire, et l'établissement des caractéristiques analytiques (seuil de sensibilité, ...) du dosage par chromatographie liquide haute performance, ont été réalisées pour établir les conditions expérimentales optimales d'étude du transport.

L'étude des caractéristiques du transport de la mitoxantrone (directionnalité, saturabilité, inhibition) sont en cours de réalisation.

5. Conclusions et perspectives.

L'obtention de la bourse "Amélie-la-vie" a permis l'obtention de données nouvelles qui permettront de mieux comprendre les mécanismes qui régissent la pénétration des médicaments anti-tumoraux dans le cerveau, et dans les tumeurs plexuelles et épendymaires.

- Nos travaux réalisés chez l'animal montrent que la Pgp n'est associée qu'aux capillaires cérébraux alors que la MRP1 est essentiellement retrouvée au niveau des plexus choroïdes. Cette distribution hétérogène des protéines de résistance multiple aux médicaments montre que les deux interfaces régulent la pénétration des médicaments du sang vers le LCR et le parenchyme cérébral par des mécanismes différents.

- Nos résultats apportent des éléments nouveaux concernant la localisation de MRP1 et de BCRP au niveau de l'épendyme et de l'épithélium plexuel chez l'homme. Nous avons montré la localisation basolatérale de MRP1 au niveau des plexus choroïdes chez l'homme, et probablement la localisation de BCRP au niveau de la membrane apicale des plexus choroïdes et au niveau de la membrane basolatérale de l'épendyme chez l'homme. Ces études de localisation doivent être complétées. L'analyse fonctionnelle de cette protéine au niveau des épithélium cérébraux est en cours de réalisation.

- Au niveau des tumeurs cérébrales, trois protéines de résistance multiple aux médicaments ont été retrouvées. L'expression des messagers codant la Pgp et la BCRP est faible et peut s'expliquer par la localisation de ces protéines, montrée par nos études d'immunohistochimie, essentiellement au niveau des vaisseaux tumoraux, et non au niveau des cellules tumorales elle mêmes. Ceci est important d'un point de vue pharmacologique car cette localisation au niveau de l'endothélium des vaisseaux tumoraux peut expliquer en partie implique la résistance aux traitements de ces tumeurs. En effet, la pénétration au sein de la tumeur des médicaments circulant dans le sang va être ralentie par ces protéines, qui vont les rejeter dans la circulation.

- De plus, dans les épendymomes du très jeune enfant, nous montrons une expression de BCRP, non pas uniquement dans les vaisseaux tumoraux, mais également dans quelques cellules tumorales. Ces cellules pourraient correspondre à des cellules souches tumorales. Ceci est important à explorer car la protection des cellules souches contre les agents médicamenteux pourrait également être un facteur important pour expliquer la résistance au traitement des épendymomes et l'existence des récurrences en particulier chez l'enfant.

L'intérêt des différents résultats obtenus, même si certains sont encore préliminaires à ce stade de l'étude justifie qu'ils fassent à terme l'objet de communications dans des journaux scientifiques internationaux, car ces résultats pourraient conduire à terme à une meilleure prise en charge thérapeutique des patients. Un premier article est actuellement soumis pour publication.