

Biologie Cellulaire cours n°10
Professeur Cras
Mercredi 15 décembre 2010
8h30-10h30
Laureline Kahn/ Sonia Refk

BIOLOGIE CELLULAIRE COURS N°10 :
LES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES

I. La cellule souche cancéreuse (CSC)

- 1) Définition de la CSC
- 2) Concept de la CSC
- 3) Les thérapies ciblées permises par le concept de CSC
- 4) Caractéristiques des CSC
- 5) Généralités sur la mise en évidence des CSC

II. Tests pour étudier les cellules souches leucémiques

- 1) Le test LTC ICs
- 2) Test avec des anticorps

III. Mise en évidence des CSC

- 1) Expression des marqueurs
- 2) Side population
- 3) Formation des sphères
- 4) Tests sur les animaux

I La cellule souche cancéreuse (CSC)

1. Définition de la CSC

La notion de cellules souches cancéreuses est un concept tout à fait nouveau. L'autre terme plus exacte pouvant être employé est : cellules initiateuses de cellules cancéreuses. On a un contingent de cellules qui ont les caractéristiques d'une cellule souche normale mais qui sont responsables du développement de cancers.

Ce concept de cellules souches cancéreuses a été démontré dans le domaine des leucémies aiguës dans les années 80. Mais depuis 5 ans, c'est une notion très importante car elles touchent les tumeurs solides. En effet les cellules souches malignes se retrouvent dans plusieurs cancers. De plus se développent les nouvelles thérapeutiques ciblées : on a réussi à ce qu'il y ait beaucoup de gens cancéreux en vie, on se retrouve avec beaucoup de malades qui ont déjà eu un cancer. Le concept des cellules souches cancéreuses explique que le malade rechute, les traitements tuent les cellules cancéreuses mais n'arrivent pas à tuer les cellules souches pour éviter les rechutes. Ce concept est arrivé comme une nouvelle cellule que les thérapeutiques devraient cibler pour éviter les rechutes.

2. Concept de la CSC

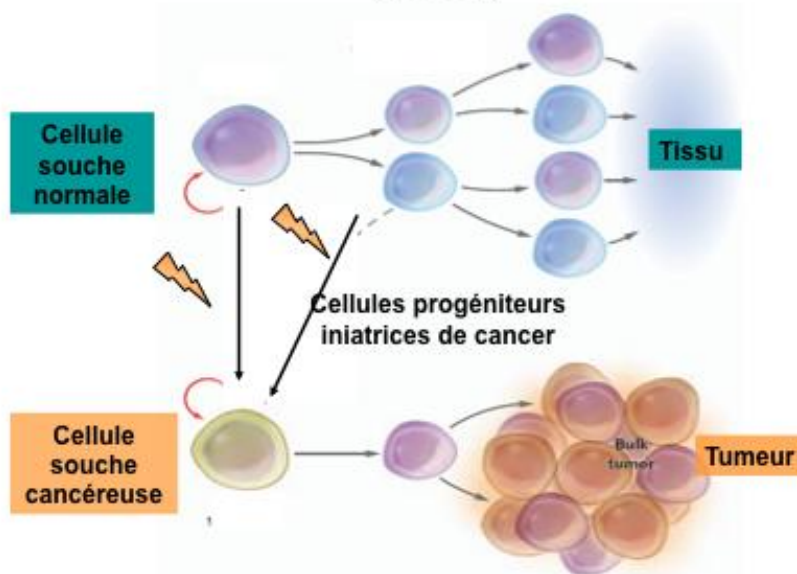
La cellule souche va se multiplier et apporter différents types de cellules plus ou moins différenciées mais appartenant toutes au même organe. Dans la tumeur toutes les cellules ne sont pas identiques, elles n'ont pas toutes une fonction comme les cellules différenciées dans le tissu normal, mais elles ont des caractéristiques différentes. Est donc venue l'idée que toutes ces cellules qui forment la tumeur proviennent d'une cellule souche cancéreuse. La complexité est qu'on ne sait pas d'où elle vient. On a :

- soit au niveau de la cellule souche normale des événements oncogéniques qui tombent sur cette cellule et elle va acquérir un potentiel pour pouvoir transmettre ces anomalies génétiques et va aboutir à toutes les cellules qui forment la tumeur
- soit ces événements oncogéniques peuvent survenir dans différentes étapes de la maturation normale de la cellule normale et ce sont ces événements oncogéniques qui vont donner des caractéristiques souches à une cellule qui n'en avait pas. On rappelle qu'à partir du moment où la cellule souche commence à

se diviser elle perd au fur et mesure certaines caractéristiques notamment d'auto renouvellement et de prolifération, puisqu'elle va aboutir à la cellule différenciée. Mais les évènements oncogéniques (ex : mutations, translocations) altèrent les gènes qui redonnent à cette cellule les caractéristiques d'une cellule souche qui va devenir une cellule souche cancéreuses.

Ce sont les mécanismes qui permettent d'expliquer qu'à partir d'un tissu sain on peut arriver à une cellule souche cancéreuse.

Concept des cellules souches cancéreuses (CSCs)



3. Les thérapies ciblées permises par le concept de CSC

Il est nécessaire de s'occuper de ces CSC pour arriver à avoir des thérapeutiques plus efficaces c'est à dire des thérapeutiques ciblée.

En effet, 75 % des traitements sont les chimiothérapies et radiothérapies, ces traitements éliminent toutes les cellules mais ne sont pas efficaces sur la cellule souches cancéreuses. Pour guérir à vie il faut tuer la cellule maligne ainsi que toutes les cellules cancéreuses. Il faut donc bien connaître son fonctionnement, son mécanisme de renouvellement, les protéines exprimées à la surface des cellule, etc ...

Pour comprendre ce qui gouverne la prolifération et la vie de ces CSC il faut connaître les voies de signalisation. Il y a beaucoup de voies de signalisation des cellules souches cancéreuses qui ressemblent aux voies de signalisation de cellules souches normales. En dehors de

quelques oncogènes la signalisation est la même : comment on passe de quelque chose qui est normal à quelque chose de pathologique?

4. Caractéristiques des cellules souches cancéreuses (très important à savoir)

La cellule souche cancéreuse est :

- douée d'un pouvoir d'auto renouvellement
- capable de Proliférer et de donner naissance à plusieurs type de cellules : c'est ce qu'on appelle dans la cellule souche normale la multipotentialité et la différenciation
- capable de pouvoir donner des tumeurs c'est à dire la tumorigénicité

5. Généralités sur la mise en évidence des CSC

La mise en évidence de ces CSC est nécessaire pour essayer de les caractériser dans les différents cancers, pour trouver de nouveaux moyens de diagnostics, pour dépister la rechute, pour trouver de nouveaux médicaments, etc.

On peut étudier en laboratoire dans des tubes à essais mais on est obligé de pratiquer des tests in vivo pour démontrer l'auto renouvellement de la cellule souche cancéreuse

But des tests : retrouver les cellule souches cancéreuses au sein de la tumeur car un certains nombres de cellules vont donner naissance à la tumeur mais les cellules (qui ne sont pas souches) engagées et différenciées ne pourront jamais donner naissance à une tumeur.

Il existe différentes sortes de tests :

Test 1 :

Chez l'homme on récupère les cellules cancéreuses et on les transplante dans la souris : la xénogreffe (greffes entre des espèces non compatibles)

Test 2 : (outil de réflexion mais qui n'a rien à voir avec les cellules des malades)

On peut travailler sur des modèles animaux qui ont des tumeurs. On travaille alors dans un modèle d'auto greffe, c'est à dire qu'on va prendre des souris transgéniques qui expriment un oncogène et qui sont malades parce qu'elles expriment un cancer et on va prélever ces cellules cancéreuses et les réinjecter sur d'autres souris.

II. Tests pour étudier les cellules souches leucémiques (CSL)

Un certain nombre de cellules sont caractérisées par des marqueurs phénotypiques à la surface comme le cd34 par exemple. Ces cellules vont donner naissance à des progéniteurs qui se multiplient, puis à des progéniteurs qui sont un peu plus engagés dans la différenciation, puis à des cellules différenciées. C'est ce qu'on connaît de la production des cellules hématopoïétiques à partir d'une cellule souche normale.

Au niveau de la cellule souche leucémique c'est à peu près le même schéma, il y a des cellules souches avec un pouvoir d'auto renouvellement et qui peuvent aussi donner naissance à un certain nombre de progéniteurs leucémiques et qui ensuite vont donner naissance aux cellules leucémiques.

A toutes ces étapes, pour les cellules souches normales, ont été mis un bon nombre de test en culture qui permettent d'étudier des cellules très progénitrices en amont.

1. Le test LTC ICs (Long term culture-initiating cells)

a) Première étape qui suggère la présence de CSL:

Ce test dure sur de longs mois car on continue toujours à obtenir les cellules cancéreuses au bout de quelques mois, cela veut dire qu'il y a quelque part dans la boîte une cellule souche.

Même test qui permet de mettre en évidence les souches leucémiques d'un malade. Au bout de plusieurs mois on arrive toujours à récupérer des cellules leucémiques, on a donc mis un mois auparavant une population de cellules qui contenait une cellule souche qui était capable de donner naissance et de s'auto renouveler.

Test in vitro qui permet de suspecter qu'on a mis en culture dans un échantillon des progéniteurs de cellules leucémiques et même des cellules souches de cellules leucémiques.

b) Pour confirmer in vivo :

On part de la population leucémique du malade qu'on va injecter à des souris et on va voir si il y a des cellules capables de donner naissance à une leucémie. Pour que la greffe prenne, il faut que le système immunitaire de la souris soit à 0 pour ne pas fabriquer des anticorps qui vont tuer les cellules humaines. On prend donc des souris déjà

manipulées génétiquement, immunodéficientes, et on les irradie. A ce moment là on injecte les cellules humaines et on attend.

S'il y a des cellules souches cancéreuses, elles donnent naissance à des cellules leucémiques à peu près au bout de 6 semaines, il y a donc apparition de cellules leucémiques humaines chez la souris vers 6 semaines.

Pour dire que les cellules leucémiques sont bien celles de l'humain il faut qu'elles aient les mêmes caractéristiques que les cellules humaines souches du départ.

On a donc démontré qu'il y avait bien dans l'échantillon de départ des cellules souches ou progénitrices (car pour le moment on a juste démontré que c'étaient des cellules capables de donner naissance à des cellules leucémiques). On a au moins les cellules progénitrices, sont-elles souches ?

c) Deuxième étapes pour confirmer la présence de CSL :

On reprend les cellules leucémiques humaines qu'on a obtenu chez la souris 1, et on l'injecte à la souris 2. Si la souris 2 a de nouveau une leucémie qui ressemble à celle la souris 1 c'est qu'il y avait des cellules souches qui ce sont non seulement multipliées mais aussi auto renouvelées.

Parfois on injecte les cellules et il n'y pas de développements de cellules leucémiques : l'échantillon n'a pas de cellules souches, ou cette leucémie ne contient pas de cellules souches, ou bien la souris n'est pas assez immunodéprimée.

→ Toutes les tumeurs n'ont pas un taux de greffabilité à 100 %
On définit le taux de greffes, et la fréquence des cellules souches leucémiques.

d) Evolution vers un test plus quantitatif

On prévoit d'injecter les cellules cancéreuses d'un malade à une souris et de définir le nombre de cellules souches malignes dans l'échantillon avec l'idée que plus on a de cellules souches malignes dans l'échantillon moins bon est le pronostic du malade, il risque de rechuter. Pour arriver à un test pronostic qui de la quantité de cellules souches qu'il y a dans le malade, il faut arriver à un test quantitatif. Il faut donc pouvoir estimer la fréquence des cellules souches leucémiques ou maligne au sein d'une tumeur, et pour estimer la fréquence on est obligé de passer par le test de dilution limite où on injecte des quantités différentes ex : 3 souris avec 5 cellules de la tumeur ,3 autres avec 15 cellules, etc. On va pouvoir

déterminer la fréquence minimale des cellules souches dans une tumeur.

2. Test avec des anticorps

But : essayer de trouver un traitement qui tue la cellule souche leucémique en plus de tuer les cellules leucémiques elles mêmes.

Expérience : Les chercheurs sont partis d'un échantillon de cellules leucémiques d'un malade. Ils ont injecté les cellules à des souris, ont attendu que la greffe prenne, ils ont attendu que les souris deviennent malades, puis sur certaines souris ils ont ajouté un anticorps anti CD44 , qui cible une protéine à la surface des cellules leucémiques ,et sur d'autres non.

Puis ils ont pris les cellules de la moelle osseuse des souris, ils les ont traitées puis réinjectées dans d'autres souris et ont regardé s'il restait des cellules souches. En regardant on a remarqué qu'il n'y avait pas de leucémie sur les cellules traitées par l'anticorps CD44 alors que sur les autres si.

Ce traitement qui cible la protéine CD44 à la surface des cellules leucémiques d'un malade est non seulement capable de traiter la leucémie mais également de cibler la cellule souche leucémique. On est arrivé à transposer ces techniques à toutes les cellules cancéreuses.

III. Mise en évidence des CSC

Comment trouver une cellule souche dans une tumeur solide ? (Tumeur: lien solide entre les cellules cancéreuses alors que les cellules leucémiques circulent entre elles.)

Il faut d'abord dissocier les cellules de la tumeur (dissociation par digestion enzymatique). On prend un bout de tumeur, on découpe, on met dans la boîte de pétri puis on commence à mettre les enzymes qui vont couper les ponts entre les cellules. On doit faire ensuite une filtration.

Après toutes ces étapes on a une population de cellules qui sont en circulation dans le milieu : on a une suspension cellulaire.

On essaye de partir d'un certain nombre de marqueurs qui sont exprimés à la surface des cellules pour essayer à partir d'un magma d'enrichir le magma cellulaire malade en une population de cellules qui pourraient être progéniteurs ou cellules souches. Ceci se fait par différentes manières :

- soit par des marqueurs qui reconnaissent les protéines à la surface des cellules,
- soit par des caractéristiques de cytométrie de flux qui permettent d'enrichir en population souche qu'on appelle la population « sur le coté » (en cytométrie les cellules souches sont sur le coté)
- soit dans les tumeurs solides on a des techniques de culture qui font que dans cette suspension cellulaire les cellules souches se mettent ensemble en sphère,

Ces 3 techniques sont des techniques utilisées dans les tumeurs solides pour enrichir l'échantillon de départ en cellules souches.

1) Expression des marqueurs

Dans tous les cancers on a trouvé des protéines exprimées à la surface des cellules qui permettent d'enrichir l'échantillon en cellules souches cancéreuses.

Ex : le CD44 est non seulement un marqueur des cellules souches leucémiques mais aussi du sein, du colon, de la thyroïde et du pancréas. Le CD133 est aussi très présent.

On remarque qu'on n'a pas énormément de protéines exprimées à la surface de cellules qui permettent d'enrichir une population tumorale en cellules souches cancéreuses.

Ils sont partis de suspensions cellulaires de colon ou de sein, qu'ils ont marqué avec des anticorps contre le CD44, CD24 et CD133.

Ensuite ils ont procédé à un linéage positif et linéage négatif : il y a des marqueurs protéiques à la surface des cellules différenciées (ex : si on prends le système hématopoïétique les CD11, CD13 et CD15 sont essentiellement exprimés sur les cellules différenciées). On arrive grâce à ces marqueurs à éliminer les cellules différenciées de la tumeur. On garde que ceux qui ont des marqueurs de cellules immatures.

On les incube avec des Anticorps qui sont susceptibles de reconnaître des protéines qui ne sont exprimées que dans des cellules souches. A partir de là on a les cellules qui expriment le CD133 et on voit qu'il y a un petit contingent de cellules qui sont CD133+. Ensuite on purifie à l'aide du trieur uniquement ces cellules et on les réinjecte à la souris.

On conclut que la fréquence des cellules qui expriment un marqueur qui peut être présent sur une cellule souche est variable et faible.

Pour le sein c'est pareil sauf qu'on fait un double marquage CD24 et CD44 et les cellules souches se trouvent dans la population CD44+/CD24-.

2) Side population : technique intéressante quand on ne connaît pas de marqueurs

Principe : Identifier par cytométrie de flux une population de cellules avec des cellules souches cancéreuses.

On a identifié que quand on réinjecte les cellules présentes dans l'échantillon à des souris elles donnent encore des tumeurs. Cette population est caractérisée par le fait que quand on les traite par un colorant on arrive à ne pas incorporer le colorant. Ceci est dû aux propriétés de ces cellules : elles expriment des protéines qui ne sont pas marquées par un anticorps. Ces protéines font parties des transporteurs qui contrôlent l'entrée ou non d'un certain nombre de choses dans la cellule. Cela explique pourquoi il y a des résistances à des drogues, puisqu'elles empêchent l'entrée d'un certain nombre de drogue de chimiothérapie. C'est un outil qui permet, sans anticorps, de sélectionner une petite population riche en cellules souches cancéreuses.

Avec cette technique, dans cette tumeur, suivant le malade, on a un nombre différent de cellules souches.

On a obtenu après tri des cellules en cytométrie de flux, des cellules qui n'étaient pas de la side population : NSP (non side population) et d'autres qui en faisaient parties : SP.

Quand on a injecté les cellules de la SP à ces souris on a obtenu des tumeurs alors que en injectant la NSP : pas de tumeur.

C'est bien dans cette population SP qu'on retrouve les cellules souches cancéreuses.

Les marqueurs membranaires et la SP sont vrais aussi pour les cellules souches leucémiques. Par contre la possibilité de retrouver des cellules souches dans les sphères n'est que dans les tumeurs solides.

3) Formation des sphères

On part de la suspension liquide de la tumeur du malade et on met en culture avec un certain nombre d'ingrédients (facteurs de croissance) et on met un certain nombre de ces cellules en culture. On voit au microscope qu'au bout d'un certain temps, après que la boîte ait été mise au chaud, la grande majorité des cellules se sont étalées et adhérentes au plastique et non pas proliférées, mais il y a une formation de 2 sphères, condensées en cellules. Ces cellules viennent d'une seule cellule. On a une chance que dans ce magma il y ait au moins une cellule progénitrice de cancer, et peut être une cellule souche.

Ex : quand c'est le Sein on dit mammosphère
Sarcome : sarcosphère
Système nerveux central : neurosphère

On peut mélanger un marqueur avec la capacité de faire des sphères.
(il trie les cellules en fonction du marqueur CD133 et après ça ils les ont mis en culture : cela confirme bien que dans la population CD133 il y a bien des cellules souches cancéreuses puisque quand on les mets en culture c'est là où il y a le plus de sphère. Quand on prend la population CD133 – on n'a pas de sphère.)

On suspecte que dans ces sphères on a au moins la cellule progénitrice. On ne sait pas si on a la cellule souche capable d'auto renouvellement. Ceci peut être démontré qu'à partir du moment où on sait qu'il y a au moins une cellule qui a donné naissance à toutes les autres. Il faut savoir si dans ces cellules, la cellule de départ c'est elle aussi auto renouvelée: si elle s'est auto renouvelée cela veut dire que dans ces cellules là il y a encore une cellule souche.

On reprend la sphère, on la redécoupe, on essaye de faire des cellules dissociées de ce magma et on les remet en culture. Si à chaque fois on obtient encore des sphères, cela veut dire qu'à chaque fois la cellule qui a donné naissance aux sphères c'est aussi auto renouvelée.

L'échantillon contient donc des cellules souches

Ces sphères permettraient de ne pas passer par la souris.

Malheureusement il n'est pas toujours facile d'avoir des sphères : dans les leucémies on n'arrive pas à avoir de sphères.

C'est aussi un test pronostic. En effet, plus un échantillon d'un malade est capable de donner des sphères, plus il est riche en cellules souches cancéreuses, plus la tumeur est agressive.

NB : malheureusement on a encore besoin de l'animal.

4) Tests sur les animaux / Test in vivo :

C'est le Test ultime pour les cellules leucémiques.

Pour les tumeurs solides : à peu près pareil. Il faut partir d'animal immuno-déficient. Il faut injecter la subvention cellulaire, souvent en sous-cutané, mais on essaye de les injecter dans l'organe qui correspond à la tumeur.

Il faut démontrer que ce que l'on obtient chez la souris est une tumeur (tumorigénicité), qu'il y a bien un auto renouvellement de cette cellule, et qu'on obtient bien tous les aspects des cellules tumorales de la tumeur d'origine (multi potentialité).

Les interactions avec la MEC sont importantes pour la greffe des cellules souches et c'est pour ça qu'il est important d'essayer de recréer une niche adéquate pour les cellules humaines dans la souris.

Ex : On a ici des cellules d'une malade atteinte du cancer de sein qu'on a marquées par un anticorps anti CD44 et un anti CD24. On a trié et purifié ces cellules au cytomètre. Les cellules uniquement CD24- et CD44+ sont injectées à la souris qui fait une tumeur. On la prend, on la découpe, on la dissocie et on la marque par du CD44 ET CD24 humain. La tumeur est identique. Immunophénotype et morphologie de la tumeur initiale : c'est la multipotentialité.

On a bien une cellule dans l'échantillon qui est capable de donner naissance à une tumeur. On a au moins des progéniteurs.

Est ce que ces cellules sont souches ? (Caractéristique d'auto renouvellement en plus)

Les cellules de la tumeur sont réinjectées à une autre souris, on réobtient à chaque fois une autre tumeur → auto renouvellement
Pour être parfait il faut un témoin négatif : on injecte aussi les tumeurs non tumorigènes : pas d'apparition de tumeurs.

Ces cellules souches sont responsables de cancers puis de métastases.

Ex : on part d'un cancer du sein. Dans cette masse tumorale on a la fois des cellules souches cancéreuses CD44+, CD24-. On traite par radiothérapies et chimiothérapies. On a éliminé le cancer mais il reste toujours les cellules souches cancéreuses responsables de la rechute. Elle peut aller se promener ailleurs que dans le sein et se nicher dans d'autres organes puis se multiplier et être à l'origine des métastases. C'est important de cibler le CD44.

On a travaillé avec un modèle de xénogreffe. On prend les cellules d'un cancer du sein d'une patiente pour lequel on sait déjà qu'elle a rechuté. On l'injecte chez la souris.

Au cours des semaines apparaît la tumeur puis grossit. On traite la tumeur par chimiothérapie. D'abord rémission complète puis la souris rechute.

On a pris l'endroit où on avait touché les cellules et on a vu qu'il y avait un peu de cellules où il y avait du CD44.

On a refait la même chose (cellules injectées dans souris puis chimio) puis au moment de la rémission on a traité par l'Anticorps antiCD44 → pas de rechute. Il y avait donc des cellules souches restantes dans la tumeur, et grâce à l'anticorps anti CD44 elles ont été détruites.

Conclusion :

On part de la tumeur, on la dissocie, on fait des tries grâce à nos marqueurs, on la met en culture pour obtenir des petites sphères. On est obligé de passer par la souris pour démontrer qu'on a bien les cellules souches. On essaye, par toutes les techniques actuelles, de caractériser les voies de signalisation des cellules souches cancéreuses. C'est quand on aura bien identifié les voies de signalisation spécifiques des cellules souches cancéreuses, qu'on pourra avoir des marqueurs pronostics et diagnostics et surtout de développer des médicaments et traitements (ex : anticorps anti CD44) qu'on testera sur les souris.