

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science-Technologie-Santé

Institut Sciences de la Vie Santé

Faculté de Pharmacie

Laboratoire de Chimie Analytique et de Bromatologie

Equipe d'accueil EA 3842 : Homéostasie Cellulaire et Pathologies

Année 2007

Thèse N°

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline / spécialité : Chimie Analytique et Biologie cellulaire

présentée et soutenue publiquement par

Gaëlle BEGAUD

le 28 Septembre 2007

*Fractionnement par couplage Flux Force de
Sédimentation : applications au tri cellulaire
dans le domaine de l'oncologie*

Thèse dirigée par Monsieur Le Professeur P.J.P. CARDOT et Monsieur Le Docteur S. BATTU

JURY

Monsieur Le Professeur Jean-Louis BENEYTOU

PRESIDENT

Monsieur Le Professeur Pierre BROSSIER

RAPPORTEUR

Monsieur Le Docteur Alain FOUCAULT

RAPPORTEUR

Monsieur Le Professeur Ulrich HOCHBERG

EXAMINATEUR

Monsieur Le Professeur Philippe CARDOT

EXAMINATEUR

Monsieur Le Docteur Serge BATTU

EXAMINATEUR

REMERCIEMENTS

A Monsieur Le Professeur Philippe CARDOT

Professeur des Universités au laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie
Faculté de Pharmacie, Université de Limoges
EA 3842 Homéostasie cellulaire et Pathologies
Directeur de thèse.

Recevez, chef, mes plus sincères remerciements pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir soutenue au cours de ces années, notamment lorsque mes choix personnels ont interféré dans ma vie professionnelle. Ces 4 années m'ont fait découvrir des qualités humaines insoupçonnées et insoupçonnables, j'ai pu apprécier votre intellect remarquable qui surgit en toutes circonstances même les plus inattendues... Soyez assuré, Monsieur, de toute mon estime et de mon profond respect.

A Monsieur Le Professeur Pierre BROSSIER

Professeur des Universités de Chimie Analytique au laboratoire de microbiologie médicale et moléculaire
Faculté de Pharmacie, Université de Bourgogne, Dijon
UPRES –EA 562.

Je suis très touchée de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Je vous remercie pour vos conseils et vos suggestions qui ont permis l'amélioration de ce manuscrit. Veuillez accepter mes plus sincères remerciements pour votre présence dans ce jury et soyez assuré, Monsieur de tout mon respect et de ma plus profonde gratitude.

A Monsieur Le Docteur Alain FOUCAULT

Directeur de recherche CNRS au Laboratoire commun de l'Université de Nantes, de l'Ecole des Mines de Nantes et de l'ENITIAA, le GEPEA (Génie des Procédés Environnement Agroalimentaire), Saint-Nazaire
UMR-CNRS 6144.

Veuillez recevoir, Monsieur, mes remerciements les plus respectueux pour m'avoir fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et d'en être le rapporteur. Je suis très sensible à

l'honneur que vous me faites en ayant accepté de faire partie de ce jury et je tiens à vous exprimer l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur Le Professeur Ulrich HOCHBERG

Professeur à la Hochschule Offenburgh, Mess- und Regelungstechnik und Grundlagenfächer des Maschinenbaus.

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de participer à ce jury de thèse. Soyez assuré, Monsieur, de mon plus profond respect.

A Monsieur Le Professeur Jean-Louis BENEYTOU

Professeur des Universités au laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire

Faculté de Pharmacie, Université de Limoges

UPRES EA 4021 Biomolécules et Thérapies anti-tumorales

Recevez, Monsieur, mes plus sincères remerciements pour avoir accepté la présidence de ce jury de thèse. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour votre disponibilité et pour tous les conseils que vous m'avez donnés au fil de ces longues années d'étude. Un grand merci de m'avoir orientée vers le laboratoire de Chimie Analytique et d'avoir permis cette collaboration qui a initié mes travaux de thèse. Je vous suis sincèrement reconnaissante de la confiance que vous m'avez accordée aux moments importants de ma vie d'étudiante, depuis la deuxième année de Pharmacie où vous avez accepté ma présence en MSBM, au moment de mon DEA qui fut une année difficile et pleine de doutes et pendant laquelle vous étiez à mon écoute et enfin La thèse...merci. Soyez assuré, Monsieur, de toute mon estime et de mon profond respect.

A Monsieur Le Maître de Conférences Serge BATTU

MCF au laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie

Faculté de Pharmacie, Université de Limoges

EA 3842 Homéostasie cellulaire et Pathologies

Directeur de thèse.

Les mots me manquent pour exprimer toute la gratitude que je voudrais te promulguer. Alors, tout simplement, merci. Merci de ta confiance, merci de ta disponibilité infinie, merci de ta présence et de ton écoute, merci de ta rigueur, de ton énorme adaptabilité scientifique qui nous a permis de mener à bien ces sujets variés et complexes, merci d'avoir supporté mes choix et de m'avoir soutenue tout au long de ces années...tu as su développer tes aptitudes à la patience pour moi et je sais que j'ai souvent poussé les limites...j'espère ne jamais les avoir franchies. Et merci

pour tous nos fous rires et pour avoir transformé une collaboration scientifique en complicité amicale, que je crois, redoutablement efficace. J'ai fait un rêve...celui de te taper sur l'épaule...très cher collègue !!!!!

A Madame Le Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU-MARCHAN

Professeur des Universités / Praticien Hospitalier au Laboratoire d'Immunologie

Faculté de Médecine, Université de Limoges

Directrice de l'EA 3842 Homéostasie cellulaire et Pathologies.

Je vous exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de votre équipe et de m'avoir intégrée dans votre laboratoire. Vos compétences scientifiques et votre implication m'ont permis de mener à bien ces études dans un domaine qui m'était totalement inconnu et que vous m'avez permis d'aborder avec confiance et sérénité. Soyez assurée, Madame, de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame Le Maître de Conférences Jeanny COOK-MOREAU

MCF au laboratoire d'Immunologie

Faculté de Médecine, Université de Limoges

Je vous exprime toute ma reconnaissance pour le temps que vous avez passé à corriger mes publications en anglais. En remerciant de votre disponibilité, de votre bonne humeur et de votre sourire toujours présent. Soyez assurée, Madame, de mon profond respect et de toute ma sympathie.

Je remercie la société Diaclone de m'avoir fourni gracieusement les anticorps nécessaires à ces études. Mes remerciements s'adressent plus particulièrement à Madame VERMOT-DESROCHES qui a soutenu ces travaux. J'espère que les publications issues de ces études contribueront à mieux faire connaître l'excellence de leur réactif.

Je remercie aussi tout particulièrement le Conseil Régional du Limousin ainsi que le Fond Social Européen pour leur soutien financier au cours de ces années d'étude.

Je remercie aussi vivement l'Ecole Doctorale Sciences-Technologie-Santé, toujours à l'écoute de nos problèmes, et dont les formations sont enrichissantes, ainsi que Monsieur Fontanille, Monsieur Movahhedi, avec des remerciements tout particuliers à Madame Gaëlle Peyrat pour sa disponibilité, son écoute et sa gentillesse.

RÉSUMÉ DES TRAVAUX DE THÈSE EN FRANÇAIS

L'utilisation de la technique de Fractionnement par couplage Flux Force de Sédimentation (SdFFF) dans le domaine de l'oncologie et particulièrement de la neuro-oncologie s'inscrit dans l'étude de la dynamique de populations complexes (ostéosarcome, neuroblastome) et des phénomènes de différenciation et d'apoptose. Ces applications reposent sur le concept novateur de "cellulomique" basé sur le couplage de l'efficacité du tri cellulaire par SdFFF et de la caractérisation des propriétés biologiques de sous-populations d'intérêt. Une première approche de la SdFFF concernant le suivi de phénomènes biologiques a été menée sur les amidons. Leur dégradation enzymatique par des amylases représente l'une des plus importantes réactions mises en œuvre dans l'industrie agroalimentaire. Les travaux réalisés sur l'amidon de riz et de blé ont montré une corrélation entre la cinétique de dégradation et l'évolution des profils d'élution de l'amidon (fractogrammes). La collection de fraction a également permis d'établir une corrélation entre la variation des propriétés biophysiques des particules éluées (taille, densité) et le mécanisme de réactions enzymatiques. Ainsi après cette étape de calibration, la SdFFF apparaît comme un outil permettant, par le simple enregistrement des fractogrammes, le suivi de réactions biologiques telle que l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses 1547 (ostéosarcome humain) traitées par un agent apoptotique d'origine végétale, la diosgénine. La SdFFF a également permis l'isolement de cellules pré-apoptotiques. Ce tri cellulaire, rapide (quelques minutes), sans marquage et de grande sélectivité améliore ainsi la spécificité et la sensibilité des tests biologiques utilisés pour l'étude des mécanismes impliqués au cours de l'apoptose. Après le suivi d'évènements biologiques, le tri de sous-populations d'intérêt, le troisième point d'application de la SdFFF en oncologie a consisté à l'exploration de l'écologie de la population cellulaire IMR-32 (neuroblastome humain). Deux phénotypes de cellules neuroblastiques ont été isolés et ont permis la compréhension de la cinétique de différenciation et de la relation qui existe entre les cellules neuroblastiques immatures et les cellules fibroblastiques différenciées au sein de cette lignée. Enfin ces phénotypes isolés ont servi de modèles d'étude pour tester les effets d'agents apoptotique, la diosgénine et différenciant, la rosiglitazone dans le but de trouver des stratégies thérapeutiques efficaces sur ces cancers fortement résistants aux thérapies actuelles.

Mots clés : SdFFF, tri cellulaire, oncologie, neuro-oncologie, monitoring, apoptose, phénotypes, différenciation, écologie de population cellulaire, ostéosarcome, neuroblastome, amidon.

ABSTRACT

The use of the Sedimentation Field Flow Fractionation (SdFFF) technology in the field of oncology, and particularly in the neuro-oncology registers, is now implicated in the study of the dynamics of complex populations (osteosarcoma, neuroblastoma) and differentiation or apoptosis phenomena. These studies lie on the new concept of “cellulomic” based on the hyphenation of SdFFF cell sorting and the biological characterization of interesting sub-populations. The first approach of SdFFF was performed with the monitoring of biological events in starch populations. Enzymatic starch granule amylosis is one of the most important reactions in food and pharmaceutical industrial processes. Studies on wheat and rice starches demonstrated a correlation between fractogram changes and enzymatic hydrolysis. These results showed the interest in coupling SdFFF sub-population sorting with particle size measurement methods to study starch size/density modifications associated to hydrolysis. After this first step of calibration, SdFFF proved to be a fast, practical and specific method to monitor biological events. This was extended to the study of diosgenin (plant steroid) induced apoptosis of 1547 osteosarcoma cells. Moreover, SdFFF was used, for the first time, to perform the isolation of pre-apoptotic cells. This pre-apoptotic sub-population which is in an early stage of apoptosis could be used as cellular model for the study of diosgenin induced apoptotic kinetics. This fast, tagless and very selective method also increases specificity and sensibility of biological tests used to study apoptotic mechanisms. After the monitoring of biological events, the sorting of specific sub-populations of interest, the third SdFFF application in oncology consisted in the study of the ecology or the phenotypical relationship in the complex IMR-32 cell line, used as a model of neuroblastoma. These cell lines have a great clinical and biological heterogeneity which affects response to treatment and patient outcome. For the first time, two phenotypes of neuroblastic, N-type, cells have been sorted by SdFFF, and allowed the understanding of differentiation kinetics and the relationship which exists between N-type and differentiated, S-type, cells. Finally, these isolated phenotypes were used as cellular models to test specific responses to apoptotic inducers, Fas ligand or diosgenin and differentiating inducers, retinoic acid or rosiglitazone in order to find new effective therapeutic strategies for these tumors actually resistant to chemotherapies.

Keywords : SdFFF, cell sorting, oncology, neuro-oncology, monitoring, apoptosis, phenotypes, differentiation, cell line ecology, osteosarcoma, neuroblastoma, starch.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	4
FRACTIONNEMENT PAR COUPLAGE FLUX-FORCE	5
A. Principes généraux de la FFF.....	5
B. Les modes d'élution.	9
C. Facteur de rétention.	14
CANCER.....	19
A. Généralités	19
B. apoptose.....	20
C. Différenciation	43
D. Notions de cellules souches cancéreuses.	57
TRI CELLULAIRE PAR SDFFF : MÉTHODOLOGIES ET APPLICATIONS	61
A. Sedimentation Field-Flow Fractionation : recent advance in instrumentation and cell separation application.	Erreur ! Signet non défini.
MATERIELS ET METHODES.....	84
FRACTIONNEMENT PAR COUPLAGE FLUX FORCE DE SEDIMENTATION (SDFFF).....	85
A. La SdFFF.....	85
B. Instrumentation.....	86
C. Développement instrumental de phase-1.	87
D. Matériel chromatographique.	93
CULTURES CELLULAIRES.	94
A. Lignée d'ostéosarcome humain 1547.....	94
B. Lignée neuroblastique humaine IMR-32.....	95
C. Condition de stimulation des cellules.....	96
ETUDE DE LA VIABILITE ET DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRES.	97
A. Méthode d'évaluation de la viabilité cellulaire par le test au MTT.	97
B. Détection de la prolifération des cellules par incorporation de BrdU.....	97
C. Étude de la morphologie des cellules traitées à la diosgénine par microscopie optique à contraste de phase.	98

DÉTECTION DE LA MORT CELLULAIRE.	99
A. Détection de la libération des nucléosomes solubles par la méthode E.L.I.S.A.	99
B. Mise en évidence de l'apoptose par la méthode TUNEL.....	100
C. Mise en évidence de l'apoptose par Annexine V-FITC et cytométrie en flux.....	100
IMMUNOCYTOCHIMIE PAR IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE.	102
A. Principe.	102
B. Les contrôles.	104
COMPTEUR DE PARTICULES COULTER COUNTER®	105
A. Principe.	105
RESULTATS / DISCUSSION	107
SUIVI (MONITORING) PAR SDFFF DE L'HYDROLYSE α -AMYLOSIQUE DES AMIDONS DE RIZ ET DE BLE	108
A. Sedimentation Field Flow Fractionation Monitoring of Rice Starch Amylolysis.	110
B. Sedimentation Field Flow Fractionation Monitoring of Bimodal Wheat Starch Amylolysis.	127
C. Discussion / Conclusion	145
ISOLEMENT DE CELLULES PRE-APOPTOTIQUES. INFLUENCE DE L'ÉPAISSEUR DU CANAL SUR L'EFFICACITÉ DU TRI CELLULAIRE.	149
A. Pre-apoptotic sub-population cell sorting from diosgenin apoptosis induced 1547 cells by Sedimentation Field-Flow Fractionation. The effect of channel thickness on sorting performance.	151
B. Discussion /Conclusion	171
ETUDE DE LA LIGNÉE NEUROBLASTIQUE IMR-32.....	173
A. Study of the phenotypic relationship in the IMR-32 human neuroblastoma cell line by Sedimentation Field Flow Fractionation.....	175
B. Etude de l'apoptose et de la différenciation sur les phénotypes cellulaires triés par SdFFF à partir de la lignée IMR-32.....	196
C. Discussion /Conclusion	209
DISCUSSION GENERALE	212
CONCLUSIONS / PERSPECTIVES	223
BIBLIOGRAPHIE GENERALE.....	224

LISTE DES FIGURES

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	4
FRACTIONNEMENT PAR COUPLAGE FLUX-FORCE	5
Figure 1 : schéma général d'un appareillage de FFF.....	6
Figure 2 : schéma général d'un canal de FFF.....	6
Figure 3 : principe général de séparation par FFF. L : hauteur d'équilibre de la particule dans l'épaisseur du canal / V : vitesse linéaire de la particule.....	7
Figure 4 : mécanisme général du mode d'éluion normal ou brownien.....	10
Figure 5 : mécanisme général du mode Inertiel.....	12
Figure 6 : mécanisme général du mode Stérique.....	13
Figure 7 : variation de R_{obs} du pic de cellules (lignée IMR-32) en fonction du champ et du débit.....	16
Figure 8 : vérification de la mise en œuvre du mode Inertiel. Elution d'une population cellulaire polydisperse, la lignée neuroblastique IMR-32.	16
Figure 9 : vérification de la mise en œuvre du mode Inertiel lors de l'éluion d'une population cellulaire polydisperse (lignée 1547)..	18
CANCER.....	19
Figure 10 : description schématique et microscopique des modifications morphologiques intracellulaires qui surviennent au cours de l'apoptose.	23
Figure 11 : détection de la condensation de l'ADN par DAPI (A) et de sa fragmentation par électrophorèse sur gel d'agarose (B).	23
Figure 12 : voies d'induction de l'apoptose par les récepteurs de mort.....	25
Figure 13 : composition du récepteur Fas.....	26
Figure 14 : représentation des voies extrinsèque et intrinsèque induites par la caspase-8.	28
Figure 15 : Elimination des cellules pathogènes par les lymphocytes T CD8+.	30
Figure 16 : schéma simplifié d'implication du dérèglement de l'apoptose dans certaines pathologies telles que le cancer.....	34
Figure 17 : coupe anatomique d'un os atteint d'ostéosarcome.....	35
Figure 18 : anatomie pathologique des ostéosarcomes.....	36
Figure 19 : la diosgénine : structure chimique.....	41
Figure 20 : photo d'un enfant présentant une masse abdominale, localisation privilégiée des tumeurs neuroblastiques.....	46
Figure 21 : neuroblastome en sablier.	46
Figure 22 : scintigraphie au mIBG.....	48
Figure 23 : notion d'auto-renouvellement et de division symétrique et asymétrique d'une cellule souche.....	57
TRI CELLULAIRE PAR SdFFF : MÉTHODOLOGIES ET APPLICATIONS	61
Figure 24 : schematic organization of SdFFF cell sorting.....	72
Figure 25 : example of calibrated fractogram.....	74

Figure 26 : apoptosis and differentiation monitoring in HEL cell line by SdFFF.....	77
Figure 27: schematic protocol to investigate induced biological events mechanism and kinetics.	81
MATERIELS ET METHODES.....	84
FRACTIONNEMENT PAR COUPLAGE FLUX FORCE DE SEDIMENTATION (SDFFF).....	85
Figure M1 : schémas comparés des appareillages de GFFF (A) et de SdFFF (B).	85
Figure M2 : schéma général d'un appareil de SdFFF (coupe transversale).	86
Figure M3 : photographie d'un bol de centrifugation dans lequel est inséré le canal.	86
Figure M4 : schéma de la coupe transversale et vue éclatée d'un joint tournant.	88
Figure M6 : photographie d'un orifice percé dans le bol de centrifugation permettant le passage des tubulures d'entrée et de sortie.	90
Figure M7 : effet du serrage sur la forme des pics de volume mort.....	91
Figure M8 : comparaison entre les 2 phases de prototypes	92
COMPTEUR DE PARTICULES COULTER COUNTER®	105
Figure M9 : principe d'aspiration, de détection et de comptage des particules par Coulter Counter.....	106
RESULTATS / DISCUSSION	107
SUIVI (MONITORING) PAR SDFFF DE L'HYDROLYSE α-AMYLOSE DES AMIDONS DE RIZ ET DE BLE	108
Figure RI-1: representative fractogram of native rice starch after SdFFF elution.	117
Figure RI-2 : microscopic observation of rice starch.....	119
Figure RI-3 : SdFFF monitoring of native rice starch enzymatic hydrolysis after 2 to 30 h incubation.....	120
Figure RI-4 : particle size distribution of control rice starch.....	122
Figure RI-5 : particle size distribution evolution of rice starch during amylolysis.	123
Figure RII-1 : representative fractogram of native wheat starch after SdFFF elution.....	133
Figure RII- 2 : particle size distribution of native wheat starch.	134
Figure RII- 3 : particle size distribution of SdFFF eluted control wheat starch.	135
Figure RII-4 : microscopic observation of wheat starch.....	138
Figure RII-5 : SdFFF monitoring of native wheat starch enzymatic hydrolysis after 2 to 25 h incubation. E	139
Figure RII- 6 : particle size distribution changes in SdFFF eluted wheat starch during amylolysis..	141
Figure RII-7 : particle size distribution changes SdFFF eluted wheat starch during amylolysis : B articles.	143

ISOLEMENT DE CELLULES PRE-APOPTOTIQUES. INFLUENCE DE L'ÉPAISSEUR DU CANAL SUR L'EFFICACITÉ DU TRI CELLULAIRE..... 149

Figure RIII-1 : representative fractograms of 1547 control and diosgenin incubated cells after SdFFF elution with two separation devices: 157

Figure RIII-2: cellular morphological modifications..... 163

Figure RIII-3 : the "125 µm" device : SdFFF fractogram of treated cells, fraction collection and morphological aspect of eluted cells. 164

Figure RIII-4 : the "175 µm" device: SdFFF fractogram of treated cells, fraction collection and morphological aspect of eluted cells. 165

Figure RIII-5 : comparison of treated 1547 cell viability by the MTT test, 72 hours sub-culture after SdFFF elution using "125 µm" or "175 µm" devices..... 166

Figure RIII-6 : comparison of treated 1547 cell apoptotic ratios, 72 hours sub-culture after SdFFF elution using the "175 µm" device..... 168

ETUDE DE LA LIGNÉE NEUROBLASTIQUE IMR-32..... 173

Figure RIV-1 : morphological aspect of the cultured IMR-32 cell lineage..... 182

Figure RIV-2 : immunological characterization of IMR-32 cell lineage..... 183

Figure RIV-3 : representative fractogram of IMR-32 cells after SdFFF elution..... 184

Figure RIV-4 : kinetics of morphological changes in IMR-32 eluted fractions (PF1, PF2 and PF3)..... 185

Figure RIV-5 : Immunological characterization of IMR-32 eluted fractions (PF1, PF2 and PF3) after 72h culture. 187

Figure RIV-6 : kinetics of nestin and PSA-NCAM expression in the IMR-32 eluted fractions (PF1, PF2 and PF3) after 24, 48 and 72h culture..... 189

Figure RIV-7 : BrdU incorporation in the IMR-32 eluted fractions (PF1, PF2 and PF3) after 48 and 72 h culture..... 190

Figure RV-1 : fractogramme obtenu avec les IMR-32.. 196

Figure RV-2 : étude de l'effet apoptotique de Fas L sur les sous-populations triées par SdFFF, par la méthode TUNEL..... 198

Figure RV-3 : évaluation de l'apoptose induite sur les cellules IMR-32 par le 7C11 par étude de l'annexine V/IP en cytométrie en flux. 199

Figure RV-4 : observations microscopiques des effets de la diosgénine à 40µM après 24 h de traitement sur les fractions. 201

Figure RV-5 : observations morphologiques par microscopie optique à contraste de phase des cellules traitées à la diosgénine (10 µM) et à la rosiglitazone (20 µM) pendant 72h. 202

Figure RV-6 : fractogrammes obtenus lors de l'élution des populations IMR-32 témoins (bleu) et traitées par la diosgénine à 10µM (rouge) ou la rosiglitazone à 20µM (noir) pendant 72h. 204

Figure RV-7 : étude de l'effet différenciant de la rosiglitazone sur les fractions..... 205

Figure RV-8 : schéma explicatif des traitements réalisés sur les fractions remises en culture. 206

Figure RV-9 : observations microscopiques de l'effet associatif de la rosiglitazone et de la diosgénine sur les fractions..... 207

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION.....	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	4
FRACTIONNEMENT PAR COUPLAGE FLUX-FORCE	5
Tableau 1 : récapitulatif des principaux champs mis en œuvre en FFF.....	8
CANCER.....	19
Tableau 2 : facteurs pronostiques du neuroblastome.....	49
TRI CELLULAIRE PAR SDFFF : MÉTHODOLOGIES ET APPLICATIONS	61
Tableau 3 : summary of apoptosis and differentiation monitoring by SdFFF in 1547 and HEL human cell lines.	78
Tableau 4 : results of SdFFF cell sorting HEL cells incubated for 96h with 10 μ M diosgenin	80
MATERIELS ET METHODES.....	84
Tableau M1 : nature, propriété, concentration et temps d'incubation des principaux effecteurs utilisés.	96
Tableau M2: liste des anticorps primaires utilisés en immunocytochimie par immunofluorescence indirecte.	103
Tableau M3 : liste des anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte.	104
RESULTATS / DISCUSSION	107
SUIVI (MONITORING) PAR SDFFF DE L'HYDROLYSE α -AMYLOSE DES AMIDONS DE RIZ ET DE BLE	108
Table RI-I : assay of reducing sugar release into the reaction mixture during native rice starch amylase hydrolysis.....	119
Table RI-II : retention ratio R_{obs} changes during raw starch enzymatic hydrolysis.....	121
Table RII-I : retention ratio R_{obs} of wheat starch elution peaks.....	134
Table RII-II : assay of reducing sugar release into the reaction mixture during native wheat starch amylase hydrolysis. Assay was performed by using Bernfield method.....	138
ISOLEMENT DE CELLULES PRE-APOPTOTIQUES. INFLUENCE DE L'EPAISSEUR DU CANAL SUR L'EFFICACITÉ DU TRI CELLULAIRE.....	149
Table RIII-I : retention ratio R_{obs} of 1547 cells and "Hyperlayer" elution mode for the "175 μ m" device..	158
Table RIII-II : determination of the average cell elevation (s) and comparison to measured cell radii.	159
Table RIII-III : experimental size selectivity S_{dObs} of 1547 cells using two SdFFF devices...	161

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

ABTS : 2,2-Azino-di-[3-éthylBenzoThiazoline Sulfonate]
Ac : Anticorps
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique Complémentaire
AR: Acide Rétinoïque
ARN : Acide RiboNucléique

B

BrdU : 5- Bromo-2'-DeoxyUridine,
BSA : « Bovin Serum Albumin », albumine sérique bovine
BDNF: "Brain Derivated Neurotrophic Factor"
BMP4: "Bone Morphogenetic Protein 4"

C

Casp-8 : Caspase 8
Caspase : "Cysteinyl aspartate-cleaving protease"
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
CRD : « Cystein Rich Domain »

D

DAPI : 4,6-DiAmidino-2-PhénylIndole
DD: "Death Domain", domaine de mort
DED : « Death Effector Domain »
DHEA : DeHydroEpiAndrosterone
Dios : diosgénine
DISC : « Death Inducing Signalling Complex », complexe de signalisation de la mort induite
DMSO : DiMéthylSulfOxide
DNase : DésoxyriboNucléAse
 $\Delta\Psi_m$: potentiel membranaire mitochondrial
DMSO : diméthylsulfoxyde
DR4, DR5: « TRAIL Receptor 1 », « TRAIL Receptor 2 », récepteurs de TRAIL

E

EDTA: "Ethylène-Diamine-Tétraacétic Acid"
ELISA: "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"
ER : « Estrogene receptor », récepteur aux oestrogènes
ERK : "Extracellular signal-Regulated Kinases"

F

FACS : « Fluorescence Assisted Cell Sorting »
FADD : Fas Associated Death Domain
FADD, Daxx, RIP, FAP-1 : protéines adaptatrices
FC : « Flow Cytometry », cytométrie en flux

FITC : Fluoresceine Iso-ThioCyanate
Fas L : Fas Ligand
FAP-1 : Fas Associated Phosphatase-1

G

GFAP : “Glial Fibrillary Acidic Protein, protéine gliale fibrillaire acide

H

h : heure
HEL : Human Erythroleukemia cell Line, lignée de cellules érythroleucémiques humaines
HIF-1 α : “Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha”
HVA: HomoVanillic Acid

I

IFN- γ : InterFéroN gamma
Ig : Immunoglobuline
GFBP : “insulin-like Growth Factor-Binding Protein-1”
IL : InterLeukine
IMF : Intensité Moyenne de Fluorescence
INPC: “International Neuroblastoma Pathologic Classification”
INSS : « International Neuroblastoma Staging System »
IP: iodure de propidium
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

L

LBD: “Ligand Binding Domain”, domaine de liaison du ligand

M

MACS: “Magnetic Activated Cell Staining”
MEM “Minimal Essential Medium”, milieu essentiel basal
mIBG : méthyl-Iodo-Benzyl-Guanidine
min : minute
MTT: 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide
MYCN :: “v-myc myelocytomatosis viral related oncogene”

N

N-CAM : « Neural Cell Adhesion Molecule », molécule d’adhésion cellulaire neuronale »
NGF : « Nerve Growth Factor », facteur de croissance nerveux
NT3: NeuroTrophine 3

P

PARP : Poly-ADP-Ribose-Polymérase
PBS : « Phosphate Buffer Saline », tampon de phosphate de sodium
PFA : Para-FormAldéhyde
PI3-K : Phosphatidylinositol 3-Kinase

PKC : Protéine Kinase C
PLAD: Pre-Ligand binding Assembly Domain
POD: PerOxyDase
PT : Pic Total
PF1, 2, 3 : Peak Fractions 1, 2, 3

R

RXR : 9-cis Retinoic acid Receptor

S

Sd: sélectivité
SdFFF : Sedimentation Field Flow Fractionation, fractionnement par couplage flux force de sédimentation
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE : " Sodium Dodécyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis"
SIDA: Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
SNC: Système Nerveux Central
SVF : Sérum de Veau Fœtal
SSC : Saline Sodium Citrate

T

TAE : Tris Acétate EDTA
TM: domaine TransMembranaire
TNF : "Tumor Necrosis Factor", facteur nécrosant des tumeurs
TNFR: "Tumor Necrosis Factor Receptor", récepteur du facteur nécrosant des tumeurs
TNF-R1: « TNF receptor 1 »
 t_r : temps de rétention
TRADD : « TNF-R-Associated Death Domain », domaine de mort associé au TNF-R
TRAIL: "TNF- α -Related Apoptosis Inducing Ligand"
TRAIL-R : "TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor"
TUNEL : "TdT-mediated dUTP Nick End Labelling"
Trk : récepteur à Tyrosine Kinase
Type-N : type Neuroblastoïde (type pour phénotype)
Type-S: type Stromal (type pour phénotype) encore appelé fibroblastoïde
Type-I: type Intermédiaire (type pour phénotype)
TZD : ThiazolidineDione

U

UTP : Uridine TriPhosphate

V

V_0 : Volume mort
Vmt : Volume mort total

A decorative scroll with a black outline and a white fill. The scroll is oriented horizontally and has a rolled-up appearance at both ends. The word "INTRODUCTION" is written in a bold, black, serif font in the center of the scroll.

INTRODUCTION

La SdFFF fait partie intégrante des techniques de tri cellulaire utilisant le couplage Flux Force, telles que la diélectrophorèse (DEP), la FFF électrique (EIFFF), la FFF magnétique (MgFFF)... C'est une technique apparentée aux méthodes chromatographiques, qui met en œuvre l'application conjointe d'un champ externe multi-gravitationnel et d'un flux de phase mobile ; ce qui permet de séparer des particules telles que les cellules, uniquement en fonction de leurs caractéristiques biophysiques (forme, taille, densité...). Afin de préserver la viabilité et l'intégrité cellulaires, le mode d'élution Inertiel doit être établi, ce dernier évitant tout contact des particules éluées avec les parois du canal. Dans ce mode d'élution, la rétention à champ et débit constants, dépend principalement de la taille et de la densité, les particules les plus grosses et de plus faible densité étant éluées en premier. Une première approche méthodologique a été réalisée grâce à l'étude de l'hydrolyse des amidons de riz et de blé.

La SdFFF est une méthode de tri douce, rapide, peu onéreuse, ne nécessitant pas de marquage...mais qui doit sa faible diffusion au fait que peu de machines commerciales sont disponibles et que les laboratoires doivent assurer leur propre développement technologique et instrumental. Au sein de notre laboratoire, nous avons rendu la machine compatible à la séparation d'espèces cellulaires. Au cours de ces dernières années, l'efficacité de la machine a été démontrée : respect de la viabilité, de l'intégrité et de la stérilité cellulaires ; les résultats sont répétables, reproductibles et ce avec un rendement tout à fait acceptable. La machine totalement adaptée au monde vivant a pu alors s'ouvrir à de nouvelles voies d'exploration au service de la biologie. Les deux principaux thèmes explorés se sont déclinés dans les domaines :

- de la neurologie avec l'isolement de cellules souches adultes et embryonnaires puis par l'étude de populations complexes concernant la neuro-oncologie ;
- de l'onco-hématologie, avec l'étude de processus biologiques induits dans des lignées erythroleucémiques humaines.

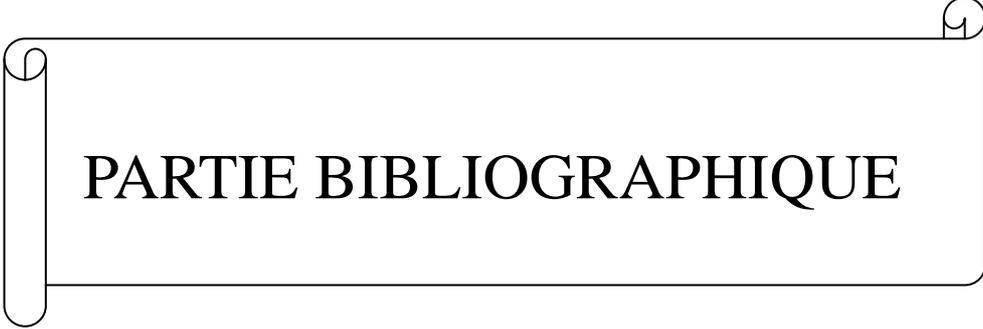
Ainsi, la SdFFF couvre un pannel de champs d'action, allant du suivi d'évènements biologiques classiques, au décryptage de relations phénotypiques complexes.

Ce manuscrit s'organise en 2 parties principales, une première partie, bibliographique, dans laquelle sont décrits :

- 1) les mécanismes fondamentaux de séparation par SdFFF avec une approche pratique par l'étude de l'hydrolyse enzymatique des amidons de riz et de blé ;
- 2) une deuxième partie comprenant des rappels sur la cancérologie, et notamment les notions majeures nécessaires à la compréhension des processus de cancérisation : l'apoptose, la différenciation et la notion de cellules souches cancéreuses.

Ces approches sont illustrées par la description de 2 modèles d'étude : l'ostéosarcome et le neuroblastome. Cette partie bibliographique est cloturée par une vision synthétique du rôle et de l'intérêt de la technique de SdFFF en matière de tri cellulaire, et notamment dans le domaine de l'oncologie.

Les résultats de nos travaux seront ensuite exposés dans la deuxième partie, et discutés selon une présentation des travaux publiés.



PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. FRACTIONNEMENT PAR COUPLAGE FLUX-FORCE

A. Principes généraux de la FFF.

Développée dans la fin des années 1960 par J.C. Giddings [1-7], la technique de fractionnement par couplage flux force ou FFF (Field Flow Fractionation), est souvent présentée comme l'une des méthodes séparatives les plus polyvalentes. En effet, la grande variété de champs utilisables, de configurations instrumentales, de modes d'élution, permet d'envisager une infinité de conditions expérimentales à mettre en œuvre pour le tri, la séparation et la caractérisation de polymères, de poudres, d'émulsions, de colloïdes, ou de bioparticules (macromolécules et cellules), dont la taille varie du nanomètre (nm) à 100 micromètres (μm) [1-7]. Paradoxalement, ce vaste champ d'investigation conduisant à la dispersion des centres d'intérêt, et le déficit d'instrumentation disponible et fiable au niveau commercial, obligeant les équipes à leur propre développement instrumental, ont longtemps contribué à ce que cette méthode reste confidentielle malgré tout son potentiel [4, 5, 8, 9]. La FFF est une "superfamille" de techniques mettant en œuvre un principe commun dans un ensemble de dispositifs instrumentaux différents selon la nature des champs appliqués (Tableau 1) [3-5]. Cette même "superfamille" se trouve rattachée à celle plus vaste des méthodes chromatographiques au travers de son mécanisme de séparation basé sur l'élution différentielle des particules, et à celle des techniques basées sur l'application d'un champ telles que l'ultracentrifugation, l'élutriation ou l'électrophorèse [2-5].

La FFF, et en particulier la FFF de sédimentation ou SdFFF, partage avec la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) une grande partie de son instrumentation (pompes, injecteurs, détecteurs, collecteurs de fractions), mais où la CLHP met en œuvre une colonne remplie de phase stationnaire, la FFF utilise un canal parallélépipédique ne contenant aucun remplissage ou phase stationnaire (Fig. 1).

La forme et la géométrie du canal sont des éléments essentiels aux performances de l'appareillage, car ils déterminent le profil d'écoulement de la phase mobile et la direction dans laquelle sera appliqué le champ externe [2-5]. Ces canaux parallélépipédiques possèdent comme principale caractéristique d'être de grande longueur ($L = 50\text{-}90$ cm, Fig. 2) en comparaison de leur largeur ($b = 1\text{-}2$ cm, Fig. 2) et de leur épaisseur ($w = 80\text{-}250$ μm , Fig. 2). Les extrémités triangulaires permettent une transition non turbulente du flux d'entrée et de sortie au flux laminaire se produisant dans le canal (Figs. 1 et 2).

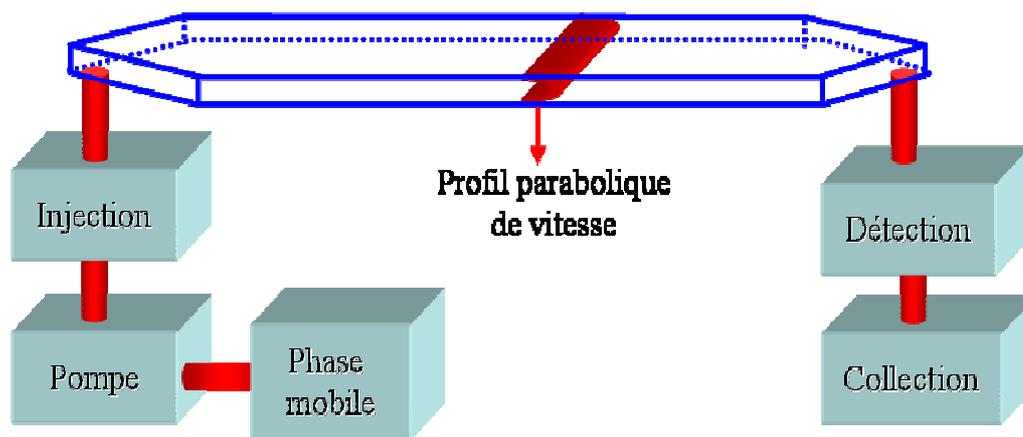


Figure 1 : schéma général d'un appareillage de FFF.

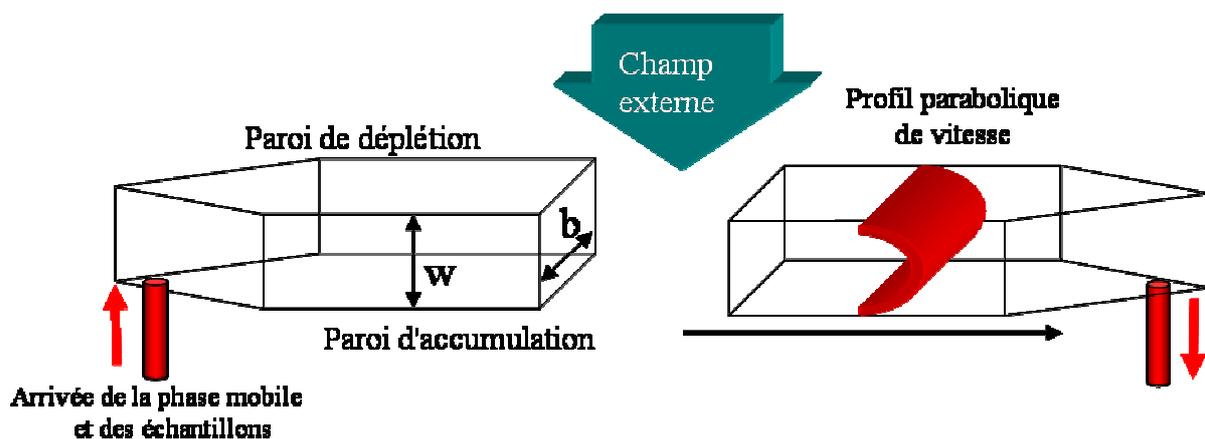


Figure 2 : schéma d'un canal de FFF. w : épaisseur / b : largeur.

A l'intérieur du canal, l'écoulement laminaire conduit à l'établissement d'un profil de vitesse parabolique : vitesse quasiment nulle au contact des parois (forces de friction) ; pour devenir maximale au centre du canal [2-5] (Figs. 1 et 2).

Ce profil parabolique s'applique sur toute la longueur du canal, mais aussi sur sa largeur, à l'exception des bords de la section où des perturbations vont exister, celles-ci sont négligeables si le rapport $b / w \approx 10^2$ [3, 10]. En pratique, le canal est obtenu par une découpe rigoureuse du parallélépipède dans une feuille de Mylar® dont l'épaisseur définira celle du canal. Cette feuille est ensuite sertie de manière étanche entre deux plaques qui constituent les deux parois principales du canal : paroi d'accumulation et paroi de déplétion (Fig. 2).

Ainsi, le choix des matériaux pour ces parois est primordial, car ce sont elles qui offrent le maximum de surface de contact avec la phase mobile et les espèces à séparer [11]. Les parois doivent transmettre le champ de façon intégrale et homogène, tout en offrant une interaction limitée ou nulle avec les espèces séparées [2, 3, 6].

Si des particules en mélange sont introduites dans le canal par l'intermédiaire du flux de phase mobile, comment se produit leur séparation ? C'est à ce niveau qu'intervient le second terme du couple Flux-Force, par la mise en œuvre d'un champ externe appliqué perpendiculairement à la grande surface du canal (Fig. 2), la paroi d'accumulation étant opposée à celle où s'exerce le champ (paroi de déplétion). On fait l'hypothèse assez logique que sous l'effet du champ les particules se positionnent à des hauteurs différentes dans l'épaisseur du canal, et progressent dans le canal à la vitesse moyenne de la ligne de flux dans laquelle elles se trouvent. Ainsi, selon la susceptibilité particulière de chaque particule au champ, des particules différentes seront confinées dans des lignes de vitesse différentes, et seront éluées à des vitesses différentes, induisant une différence de temps de rétention (t_r , Fig. 3). C'est le champ externe qui produit la différence de vitesse nécessaire à l'origine de la séparation des particules (Fig. 3) [2, 3, 6].

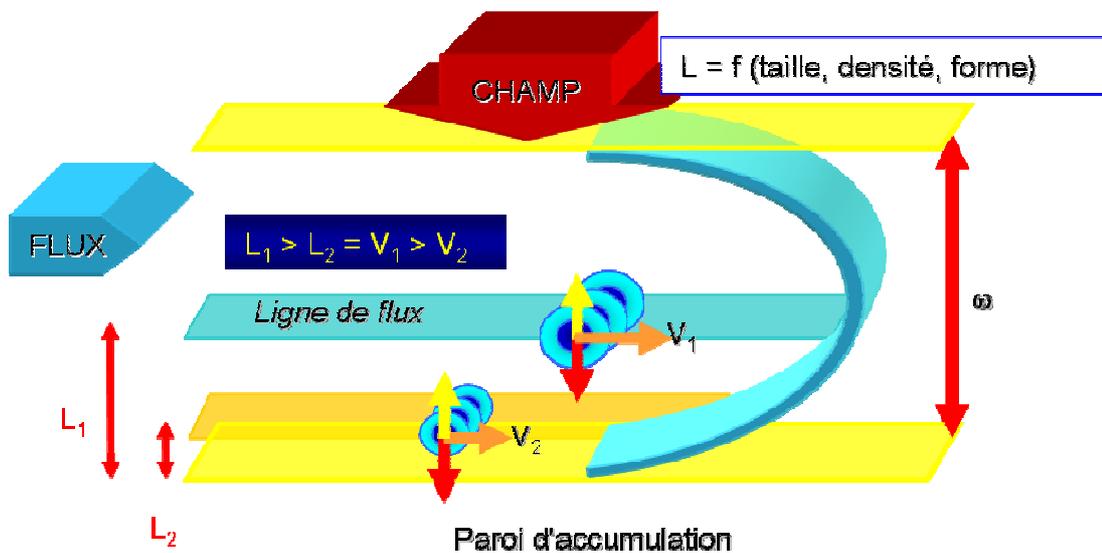


Figure 3 : principe général de séparation par FFF. L : hauteur d'équilibre de la particule dans l'épaisseur du canal / V : vitesse linéaire de la particule.

Ce principe, relativement simple, est un élément commun à l'ensemble des techniques de FFF. La variété des champs applicables est directement à l'origine de la diversité des sous familles de FFF comme le montre le tableau 1 [2-6] :

Champ	Technique
Gravité terrestre	FFF gravitationnelle : GFFF
Champ multigravitationnel	FFF multigravitationnelle ou de sédimentation : SdFFF
Thermique (gradient)	FFF thermique : ThFFF
Gradient hydrodynamique	FFF hydrodynamique : FlFFF
Electrique	FFF électrique : ElFFF
Magnétique	FFF magnétique : MgFFF
Acoustique	FFF acoustique : AcFFF

Tableau 1 : récapitulatif des principaux champs mis en œuvre en FFF.

La diversité des champs applicables est en partie comptable de la polyvalence de la FFF. Dans la plupart des cas, il est possible d'ajuster, de contrôler ou de programmer l'intensité du champ. Le champ doit [2-6] :

- être suffisamment intense pour forcer le déplacement des particules dans une région la plus fine possible dans l'épaisseur du canal,
- permettre une sélectivité suffisante pour une séparation la plus efficace possible des différentes sous-populations,
- être facile de mise en œuvre pour la construction et le développement d'une instrumentation d'accès aisé.

B. Les modes d'élution.

Le principe général de la FFF, tel que nous venons de le décrire, montre le confinement des espèces à des hauteurs différentes permettant leur élution à des vitesses différentes. Idéalement, les zones de confinement doivent être réduites à quelques micromètres ou moins, mais de nombreux facteurs conduisent à leur élargissement [12, 13]. Il existe, en effet, différents processus de distribution des particules dans la hauteur du canal, à l'origine des différents modes d'élution. Ces modes d'élution pouvant être mis en œuvre avec les différents champs précédemment décrits, cela accroît encore la polyvalence de la technique de FFF [2-6].

Selon le schéma classique d'un appareillage de FFF (Fig. 2), l'introduction de l'échantillon se fait au niveau de la paroi de déplétion. Sous l'effet du champ, les particules traversent le canal en direction de la paroi d'accumulation. Généralement, le flux de phase mobile est stoppé pendant une période nommée temps de relaxation (τ , voir équation 1).

$$\tau = \frac{w^2 \lambda}{D} \left(\frac{1}{2} - \lambda + \frac{1}{e^{\frac{1}{\lambda}} - 1} \right) \quad (1)$$

τ est d'autant plus grand que D (coefficient de diffusion moléculaire) est faible. $\lambda = \frac{\ell}{w}$, avec ℓ : distance centre de gravité du nuage de particule / paroi d'accumulation et w : épaisseur du canal.

Après un certain temps, on observe un arrêt de la migration des particules, car à l'approche de la paroi d'accumulation, les particules sont soumises à des forces ou des processus de transport s'exerçant de manière à contrebalancer l'effet du champ (force d'opposition). Ainsi la balance champ externe / forces d'opposition (diffusion pour les particules submicroniques, forces d'inertie pour les particules microniques) conduit à l'établissement d'un équilibre de distribution, définissant pour chaque particule une position d'équilibre dans l'épaisseur du canal, position à laquelle elle sera éluee à la vitesse de la ligne de flux correspondante (Fig. 3) [2-6]. Les particules n'étant pas sensibles au champ appliqué auront une vitesse de progression égale à celle de la phase mobile dans le système et pourront être utilisées pour la mesure du temps mort t_0 et du volume mort V_0 du système. En pratique, le rapport t_0 / t_r définit le facteur de rétention nommé R ou R_{obs} [14].

La nature des forces d'opposition est un élément clef de la FFF car elle détermine la distribution des particules, leur mode d'élution, leur ordre d'élution, la sélectivité et la résolution de

la méthode [2-6]. Ces forces dépendent prioritairement des propriétés physiques des particules séparées : taille, densité, forme ou diffusion moléculaire (Fig. 3) [2-6].

1. Mode normal ou mode brownien.

C'est le mode d'éluion des particules submicroniques ($< 1\mu\text{m}$: macromolécules, colloïdes, organites cellulaires...). D'un point de vu historique, il est le premier mode mis en œuvre et reste encore parmi les plus employés [2-6, 15]. Sous l'influence du champ, les particules sont confinées au voisinage de la paroi d'accumulation, où se produit une augmentation de leur concentration. Un processus de diffusion s'oppose au champ et la balance de ces forces permet la formation d'un nuage de particules ayant une distribution exponentielle dans l'épaisseur du canal (Fig. 4).

Ceci crée un gradient de concentration décrit par les équations suivantes [15] :

$$C_x = C_0 e^{\frac{-x|U_x|}{D}} \quad (2)$$

$$C_x = C_0 e^{\frac{-xF}{kT}} \quad (3)$$

où C_x : concentration de la particule à une position x dans le canal ($x \leq w$), C_0 : concentration à la paroi d'accumulation, U_x : vitesse transverse, D : coefficient de diffusion moléculaire, F : force du champ, k : constante de Boltzman, T : température absolue en degré Kelvin.

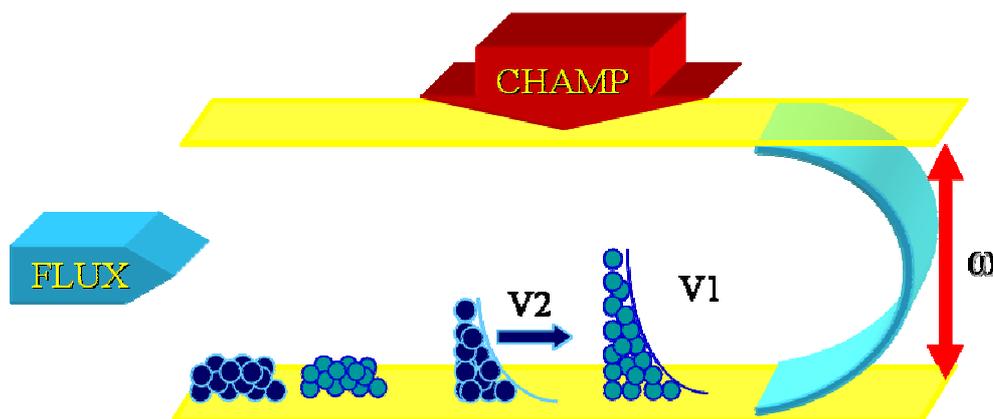


Figure 4 : mécanisme général du mode d'éluion normal ou brownien.

2. Mode Stérique-Inertiel, mode par focalisation.

Si l'on considère à présent des particules dont le diamètre est supérieur au micron, le coefficient de diffusion moléculaire est alors négligeable. En absence de flux, les particules sont conduites au contact proche de la paroi d'accumulation [2-6, 15, 16].

Ainsi, les particules ayant des propriétés de diffusion différentes (coefficient de diffusion moléculaire différent) présentent des distributions différentes, d'épaisseurs différentes. Plus l'épaisseur du nuage de particules est important, plus le centre de gravité est élevé, et plus elles seront éluées rapidement (Fig. 4). Les particules les plus petites ont un coefficient de diffusion moléculaire supérieur et sont éluées avant les particules de plus fort diamètre. C'est l'ordre d'éluition du mode normal (Fig. 4) [2-6, 15].

2.1. Mode Inertiel.

La mise en mouvement des particules dans le flux de phase mobile conduit à la génération de forces hydrodynamiques de deux types : forces inertielles et forces ascensionnelles qui s'opposent au champ externe. Les particules sont alors focalisées dans de fines couches situées au dessus de la paroi d'accumulation. Ces monocouches seront éluées à la vitesse de la ligne de flux passant par leur centre de gravité (Fig 5) [2-4, 14, 17-25].

Les forces hydrodynamiques sont décrites par les équations suivantes [14, 26] :

$$F_L = F_I + F_{asc} \approx C \frac{a^3 \eta S_o}{\delta} \quad (4)$$

$$\text{où } F_L = C \frac{a^3 \eta 6 \langle V \rangle}{\delta w} \text{ et } F_{Lasc} = 13.5 \pi \frac{\langle V \rangle^2 a^4 \rho}{w^2} g \left(\frac{x}{w} \right) \quad (5,6)$$

où F_L : forces hydrodynamiques, F_I : forces inertielles, F_{Lasc} : forces ascensionnelles, C : coefficient adimensionnel dépendant du flux de phase mobile ($\approx 7.10^{-3}$), a : diamètre des particules, η : viscosité, S_o : coefficient de Soret, δ : distance entre le centre de gravité de la monocouche et la paroi d'accumulation, $\langle V \rangle$: vitesse moyenne de la phase mobile, w : épaisseur du canal, ρ : densité de la phase mobile, x : distance paroi d'accumulation / centre de gravité de la particule.

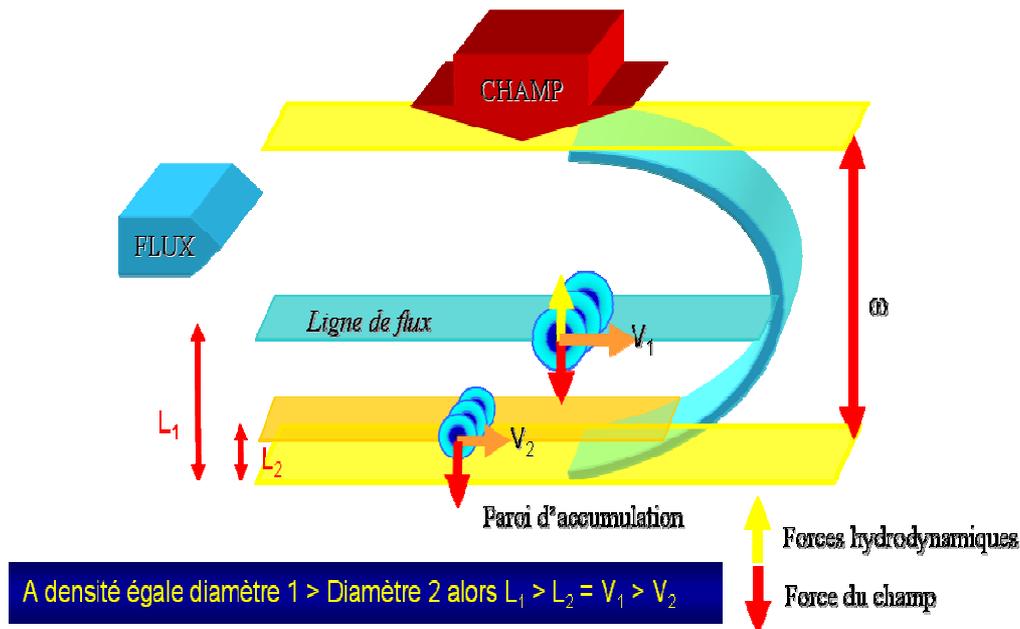


Figure 5 : mécanisme général du mode Inertiel. L : hauteur d'équilibre de la particule dans l'épaisseur du canal / V : vitesse linéaire de la particule.

A densité égale, les particules les plus grandes génèrent le plus de forces hydrodynamiques et sont situées plus haut dans le canal et seront éluées avant les particules de plus faible diamètre (Fig. 5) [2-4, 14, 17-25].

En SdFFF, la force de gravité s'exerçant sur une particule est de la forme [15] :

$$F = m \left(1 - \frac{\rho_{mob}}{\rho_{part}} \right) \omega^2 r \quad [27, 28]7)$$

où, m : masse de la particule, ρ : densité de phase mobile et de la particule, ω : fréquence de rotation angulaire, r : rayon du rotor.

A taille égale, les particules les plus denses sont plus sensibles au champ de gravité et sont éluées en dernier. Dans une population de forte polydispersité en taille et densité, les particules les plus grandes et les moins denses seront éluées en premier, alors que les plus petites et les plus denses le seront en dernier [2-4, 14, 17-25].

L'intérêt de ce mode d'éluion est évident pour l'éluion des cellules dont on connaît la fragilité et la capacité d'interaction où d'adhésion à la surface du canal. Ces interactions conduisent à des effets néfastes en terme d'induction de différenciation ou de mort cellulaire par apoptose. Dans une stratégie de séparation cellulaire ou de particules microniques, du fait de l'importante sélectivité de ce mode en fonction de la taille (a^3) et de la densité; et du faible risque d'interaction

particules-paroi qu'il offre, le mode Inertiel est un modèle de choix, dont on doit assurer la mise en œuvre [8, 11].

2.2. Mode Stérique

Il est considéré comme étant un cas limite du mode Inertiel [2-4, 14, 17-25]. Il est mis en œuvre lorsque les forces hydrodynamiques sont largement contre balancées par la force exercée par le champ externe (fort champ et / ou faible débit de phase mobile) (Fig. 6). Les particules sont focalisées dans une zone située au proche ou très proche contact de la paroi d'accumulation (Fig. 6). Dans ces conditions, où les particules semblent rouler sur la paroi d'accumulation, les plus grandes particules ont leur centre de gravité situé plus haut dans l'épaisseur du canal (ligne de vitesse plus rapide) et seront éluées avant les plus petites, comme pour le mode Inertiel [2-4, 14, 17-25] (Fig. 6).

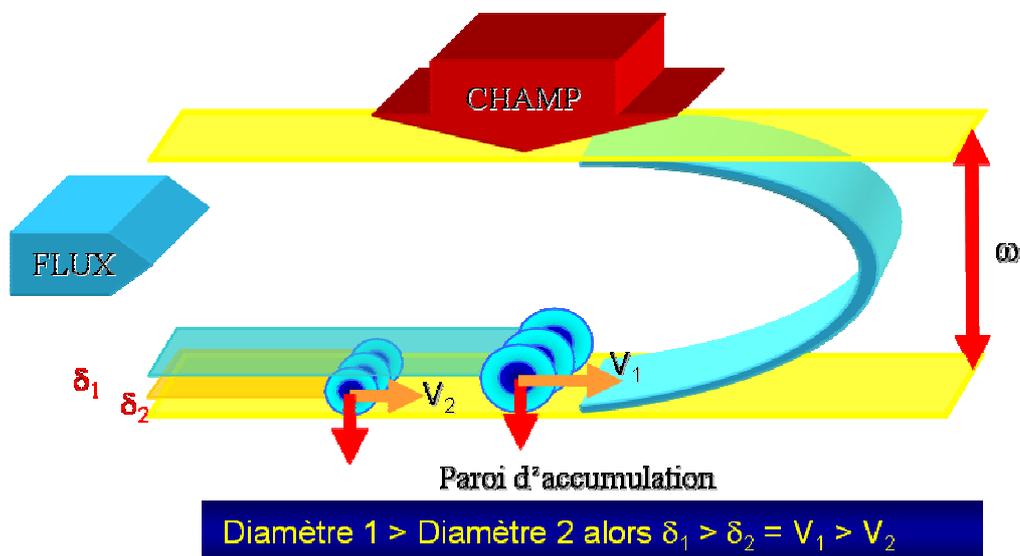


Figure 6 : mécanisme général du mode Stérique.

Les conséquences du mode Stérique sont très importantes. L'élué au proche contact de la paroi d'accumulation conduit à l'activation de la différenciation ou de la mort cellulaire, et à l'empoisonnement progressif du canal. Ceci se traduit à terme, en plus des inconvénients sur l'intégralité fonctionnelle cellulaire, par une baisse de la répétabilité, de la reproductibilité et du rendement [8, 11]. Ce mode d'élué conduit de plus, à une perte de sélectivité selon la densité.

C. Facteur de rétention.

L'une des grandeurs fondamentales de premier intérêt en chromatographie ou en FFF reste le moment d'ordre 1 ou la médiane du pic [14, 26]. Lorsque le pic est parfaitement gaussien, cette valeur est confondue avec le temps de rétention mesuré au sommet du pic, condition plutôt rare en FFF lors de l'analyse de populations polydisperses. Le facteur de rétention est donné par l'équation suivante :

$$R = \frac{M_{10}}{M_{1r}} \quad (8)$$

En pratique, $R_{obs} = \frac{t_0}{t_r} = \frac{\langle v \rangle_{mob}}{\langle v \rangle_{part}}$ [10] [14, 26], où R_{obs} est la valeur pratique du facteur

de rétention, t_0 : temps mort, t_r : temps de rétention des particules, $\langle v \rangle_{mob}$: vitesse moyenne linéaire de la phase mobile et $\langle v \rangle_{part}$: vitesse moyenne linéaire du nuage de particules.

Pour le mode normal [12, 15] :

$$R = 6\lambda \left[\coth\left(\frac{1}{2\lambda}\right) - 2\lambda \right] \quad (9)$$

où $\lambda = \frac{\ell}{w}$, avec ℓ distance centre de gravité du nuage de particule / paroi d'accumulation

et w : épaisseur du canal.

Pour le mode Stérique-Inertiel [16] :

$$R_{corr} = 6(\alpha - \alpha^2) + 6\lambda(1 - 2\alpha) \left[\coth\left(\frac{1-2\alpha}{2\lambda}\right) - \frac{2\lambda}{1-2\alpha} \right] \quad (10)$$

où $\alpha = a/w$ avec a : rayon de la particule.

On peut également écrire [16] :

$$R_{corr} = 6\gamma(\alpha - \alpha^2) + 6\lambda(1 - 2\alpha) \left[\coth\left(\frac{1-2\alpha}{2\lambda}\right) - \frac{2\lambda}{1-2\alpha} \right] \quad (11)$$

où γ est un facteur de correction stérique, prenant en compte l'effet des forces hydrodynamiques. Une écriture simplifiée peut être donnée si $\alpha \gg \lambda$: [16]

$$R = 6\gamma\alpha + 6\lambda \quad [16], \text{ et la si particule } \gg 1 \mu\text{m alors } R \approx 6\gamma\alpha = 6\gamma \frac{a}{w} \quad (12)$$

dans le cadre du mode Stérique, γ n'est pas pris en compte.

L'ensemble de ces égalités montre que la FFF permet d'établir facilement les équations de transport des analytes ou du profil de concentration. Du fait de l'utilisation de canaux ouverts, non remplis, de géométrie simple conduisant à l'établissement d'un écoulement laminaire à profil parabolique, il est aisé de traduire les grandeurs de rétention en paramètres physico-chimiques tels que : taille, densité, coefficient de diffusion moléculaire ou thermique, conduction électrique, forces hydrodynamiques. Dans des conditions d'élution parfaitement calibrées, pour des populations relativement monodisperses, la FFF est un outil de mesure de ces dimensions, ceci étant beaucoup plus difficile pour des populations polydisperses [2-4, 14, 19, 21].

D'un point de vue pratique, il faut connaître la dépendance de R_{obs} aux variations de conditions opératoires. En mode normal, R_{obs} est directement dépendant de la taille des particules (coefficient de diffusion D , Eq. 1) et du champ appliqué. Plus le champ augmente, plus R_{obs} diminue pour des particules de taille égale. R_{obs} reste indépendant du flux de phase mobile.

En mode Inertiel au contraire, si R_{obs} est dépendant du champ, de la taille et de la densité des particules, il sera également dépendant du flux de la phase mobile (création des forces hydrodynamiques). Ainsi, à champ constant, si le débit de phase mobile augmente, R_{obs} augmente. A débit constant, si le champ augmente, R_{obs} diminue [2-4, 14, 17-25].

Pour le mode Stérique, R_{obs} devient totalement indépendant du champ et du débit de la phase mobile. Les particules étant éluées au contact de la paroi, R_{obs} ne dépend plus que de leur diamètre [2-4, 14, 17-25].

En pratique, nous vérifierons la dépendance de R_{obs} aux variations du champ et du débit de phase mobile. Pour chaque nouvelle analyse de population polydisperse, nous ferons une étude systématique de la variation de R_{obs} du pic d'intérêt dans des conditions variables de champ et de débit (Fig. 7). Nous pourrons alors déterminer les conditions idéales d'élution en mode Inertiel, tout en permettant une résolution avec le pic de volume mort et une largeur de pic suffisante pour une séparation optimale des sous-populations d'intérêt.

Dans l'exemple de la figure 7, les conditions optimales retenues ont été : champ : 10 g et débit de phase mobile : 0,8 mL / min; soient des valeurs médianes qui assurent l'élution des particules en mode Inertiel.

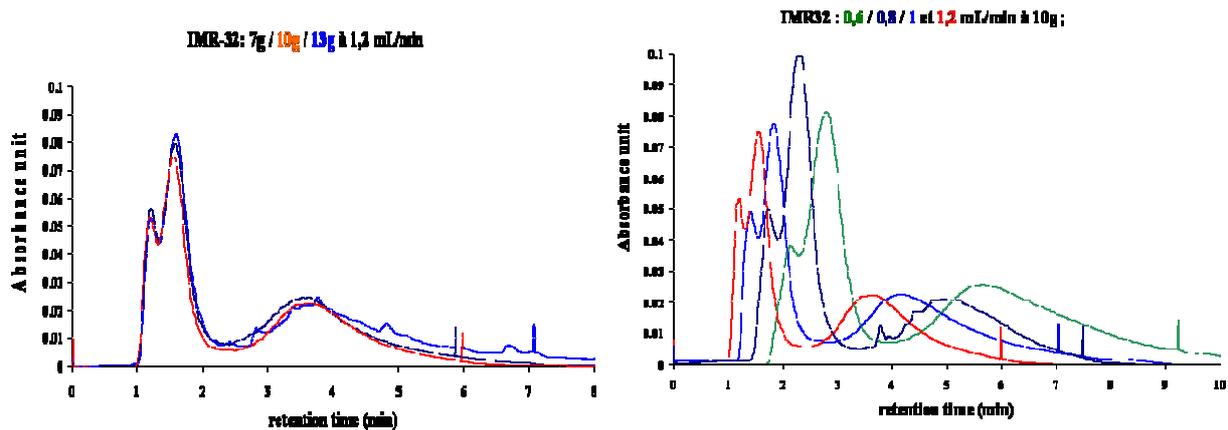


Figure 7 : variation de R_{obs} du pic de cellules (lignée IMR-32) en fonction du champ et du débit.

Un autre type d'équation peut être utilisé pour la vérification du mode Inertiel [20] :

$$R_{obs} \approx 6 \frac{s}{w} \quad (13)$$

où s : distance centre de la zone de focalisation des particules / paroi d'accumulation, ce qui correspond à l'élévation moyenne des particules dans la hauteur du canal. A partir de R_{obs} , il est facile d'estimer la valeur de s . Selon la description du mode Inertiel, les particules sont éluées au dessus de la paroi d'accumulation. Ainsi si l'on connaît la valeur du diamètre des particules éluées à cette valeur de R_{obs} , et si $s >$ rayon particules, alors le mode Inertiel est mis en œuvre (Fig. 8).

C'est ce que nous avons vérifié pour l'exemple précédent des cellules IMR-32 triées à un débit de 0,8 mL / min et à 10 g :

$$R_{obs} = \frac{t_0}{t_r} = 1,5/4,46 = 0,336$$

$$s \approx \frac{R_{obs} w}{6} = 0,336 \times 175/6 = 9,8 \mu\text{m}$$

$$a = 5,3 \mu\text{m}$$

$$s > a \text{ Mode Inertiel}$$

Figure 8 : vérification de la mise en œuvre du mode Inertiel. Elution d'une population cellulaire polydisperse, la lignée neuroblastique IMR-32.

Enfin, dans le cadre de l'application du mode inertiel, un autre paramètre peut être étudié : la sélectivité S_d , ou la capacité à séparer deux composants d'un mélange. Elle peut être définie en fonction de la taille [2, 15, 29, 30] :

$$S_d = \frac{|\text{dlog}(t_r)|}{|\text{dlog}(d)|} \quad (14)$$

S_d , par la valeur de t_r , est directement dépendante de R_{obs} , de α et λ , donc de la nature de la force mise en jeu. Pour la SdFFF, S_d est en théorie voisin de 3, ce qui est remarquable. S_d est alors la pente de la droite $\log(t_r) = f(\log(d))$. En pratique, les valeurs de cette pente en mode Stérique-Inertiel sont inférieures à 1. Après calibration de la taille des particules éluées, il est facile de tracer cette droite pour avoir une preuve supplémentaire de leur élution en mode Inertiel.

Cependant, il faut, compte tenu de l'extrême dispersion de taille d'une population cellulaire, recueillir un nombre élevé de fractions pour tracer avec précision cette droite. D'autre part, il faut disposer de standards calibrés en taille et en densité qui seraient équivalent à notre population polydisperse, ce qui pour l'instant n'est pas encore disponible. C'est pourquoi nous mettons en œuvre une méthode empirique nous permettant de calculer une valeur expérimentale de $S_d = S_{d_{\text{Obs}}}$. Cette valeur nous permet de déterminer l'influence et l'évolution de la balance taille / densité sur l'élution cellulaire, en fonction de l'induction de phénomènes biologiques tels que la différenciation ou l'apoptose [31, 32].

Pour cela nous traçons la droite définie par l'équation suivante [29, 32, 33] :

$$\log t_R = -S_d \cdot \log d + \log t_{RI} \quad (15)$$

ou $-S_d$, la pente de la droite, représente le coefficient de sélectivité en taille apparent, t_r le temps de rétention, d le diamètre des cellules et t_{RI} une constante, égale au temps de rétention d'une particule de 1 μm . Dans le cas de population homogène en densité, il est démontré que la courbe de sélectivité est une droite [29]. En l'absence de calibration, nous calculons une valeur expérimentale de la sélectivité nommée $S_{d_{\text{Obs}}}$ [32-34]. Après collection des fractions, le diamètre moyen des particules éluées est mesuré (Coulter Counter / Cytomètre en Flux), le temps de rétention est donné par le temps moyen d'élution de la fraction. Nous obtenons ainsi des droites de pentes négatives (Fig. 9).

Cela nous a été permis, avec la lignée d'ostéosarcome humain 1547 notamment, de pouvoir comparer l'efficacité de séparation de canaux d'épaisseurs différentes (175 μm et 125 μm) et l'impact sur la variation de densité de l'induction de mort cellulaire par apoptose [32].

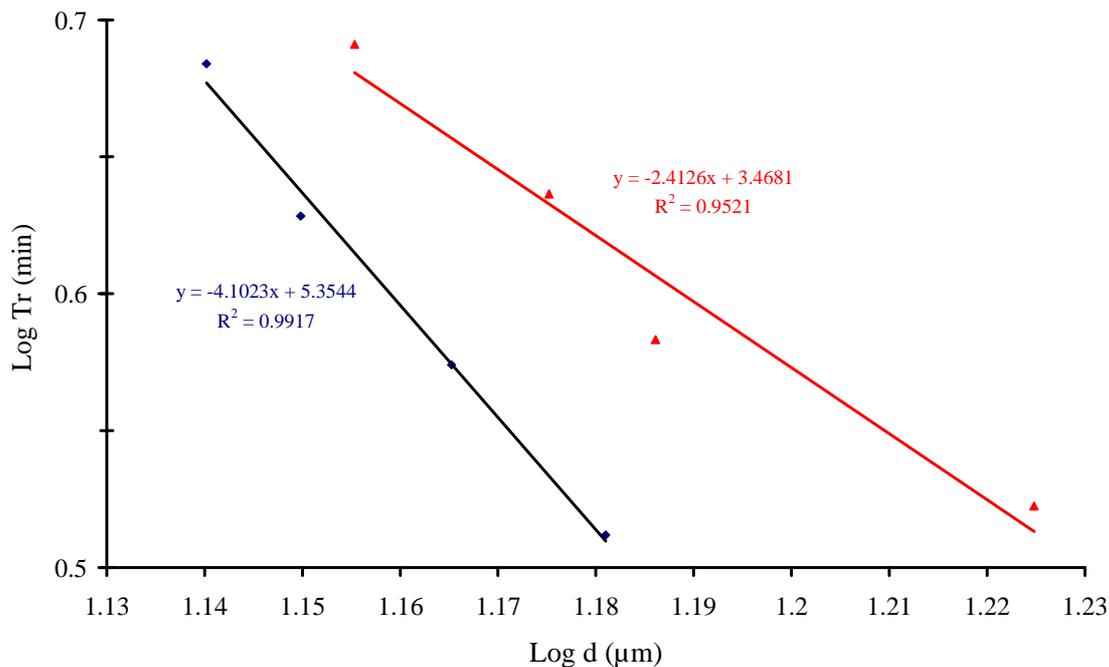


Figure 9 : vérification de la mise en œuvre du mode Inertiel lors de l'élution d'une population cellulaire polydisperse (lignée 1547). Courbe de sélectivité : $\log tR = -Sd \cdot \log d + \log tR1$. En bleu : cellules témoins, en rouge : cellules 6h en présence de diosgenine 40 μ M. Conditions d'élution : canal 125 μ m d'épaisseur; débit : 0.50 mL / min; champ : 40.00 ± 0.03 g. collection de 5 fractions de 30" chacune, à partir de 3'00" jusqu'à 5'30".

La compréhension des mécanismes du mode d'élution « Hyperlayer » a pu se faire grâce à une application pratique sur les amidons. La SdFFF a pu être utilisée afin de suivre et de caractériser un évènement biologique (monitoring) : la dégradation enzymatique des amidons 1) de riz et 2) de blé. Ces études ont permis de mettre en exergue l'importance de la balance taille / densité impliquée dans l'élution de ces particules. Enfin, la collection de fractions et l'étude des différentes populations de granules collectées nous ont permis de comprendre les modifications biophysiques qui surviennent lors de leur hydrolyse.

La SdFFF est devenue depuis quelques années un outil performant pour le suivi de processus biologiques tels que l'apoptose ou la différenciation cellulaire, ainsi que pour l'isolement de sous-populations d'intérêt d'origine cancéreuse.

II. CANCER.

A. Généralités

L'individu est constitué d'unités cellulaires morphologiquement individualisées, mais intégrées dans un ensemble pluricellulaire dynamique : l'organisme. Ce dernier, résultat de l'agencement de cellules en tissus, de tissus en organes et d'organes en systèmes, présente de nombreuses interactions avec son environnement [35]. L'organisme est un système ouvert qui réagit via des systèmes complexes mais coordonnés, afin de se maintenir dans un état stationnaire normal.

Ce maintien de l'état normal, optimal pour la vie de l'organisme [35], porte le nom d'homéostasie (*stasis* : état, position; *homios* : égal, semblable à). Le cancer est une maladie du fonctionnement même de nos cellules qui, progressivement, perdent le contrôle de leur prolifération, deviennent immortelles et se développent de manière anarchique dans l'organisme.

La vitesse de prolifération d'une population de cellules résulte d'un équilibre entre plusieurs phénomènes : division cellulaire (mitose), différenciation et mort cellulaire programmée (apoptose). Le contrôle de cet équilibre est fondamental au cours de processus physiologiques normaux, tels que le développement embryonnaire, la régénération des tissus et le vieillissement [36]. Une altération de cet équilibre peut conduire à des situations pathologiques majeures comme la formation de tumeurs ou l'apparition de certaines maladies neurodégénératives [37]. Alors que l'inhibition de l'apoptose va laisser proliférer des cellules néfastes et contribuer à la formation de cancer ; une stimulation de l'apoptose peut conduire l'organisme à se retourner contre lui-même. Le SIDA, par exemple, provoque une apoptose accrue des lymphocytes T4, diminue les défenses immunitaires de l'organisme [38] et prépare un terrain favorable aux maladies opportunistes. Les maladies neurodégénératives et les maladies auto-immunes sont elles aussi dues à une augmentation de la mort de cellules spécialisées.

La régulation de l'apoptose est assurée par un ensemble de gènes, notamment ceux contrôlant le cycle cellulaire, tels que les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs [39]. Certains de ces gènes sont fréquemment mutés dans de nombreux types de tumeurs.

La différenciation et l'apoptose sont des processus physiologiques fondamentaux qui jouent un rôle clé dans le développement et le maintien de l'homéostasie de l'organisme :

- La différenciation est un processus moléculaire qui permet à une cellule pluripotente ou indifférenciée d'exprimer des protéines spécifiques et d'acquérir des fonctions déterminées, nécessaires au bon fonctionnement du tissu, de l'organe et de l'organisme entier [40].

- L'apoptose est la mort cellulaire physiologique programmée qui permet d'éliminer des cellules superflues, indésirables ou défectueuses. Ce processus joue un rôle lors du développement, de l'organogenèse et de la défense de l'organisme contre les attaques virales et bactériennes et contre l'invasion tumorale [39].

Il est intéressant de noter que de nombreuses observations récentes montrent l'existence d'étroites connexions entre les processus de différenciation et d'apoptose, notamment dans les kératinocytes [41] et les cellules hématopoïétiques [42]. Par ailleurs, il est maintenant clairement établi qu'il existe des altérations des processus de différenciation et d'apoptose dans de nombreuses pathologies et en particulier dans le cancer [37]. En effet, les cellules cancéreuses perdent souvent certains paramètres de différenciation pour pouvoir acquérir une capacité de croissance et de migration incontrôlées. Enfin, l'altération des processus apoptotiques est à l'origine de la résistance des cellules tumorales aux radio- et chimio-thérapies et à leur élimination par le système immunitaire.

La notion de cancer s'apparente à celles d'apoptose et de différenciation ainsi qu'à la notion de cellules souches cancéreuses. Il est donc primordial de connaître les mécanismes impliqués dans ces processus pour aborder le vaste domaine de l'oncologie et pour appréhender les études menées sur les lignées cellulaires cancéreuses. Un dérèglement pathologique de l'apoptose et de la différenciation est souvent à l'origine des processus de cancérisation. L'évolution des cancers dépend essentiellement de leur réponse aux chimio- et radio-thérapies et de l'apparition de métastases, ce qui semble corrélér à la théorie des cellules souches tumorales. En effet, ces cellules ont des caractéristiques leur permettant d'échapper aux drogues anti-cancéreuses et il semblerait que seules ces cellules peuvent reformer une tumeur [27, 28].

B. apoptose.

Pour les études menées sur les lignées cancéreuses, il nous faut introduire la notion d'apoptose et notamment son importance lors des processus de cancérisation. Nous allons détailler en particulier le récepteur de mort Fas, fortement impliqué dans l'apoptose et qui joue également un rôle important dans le système nerveux central (SNC).

1. Historique et définition.

Le terme apoptose ou mort cellulaire programmée a été introduit en 1972 pour définir une forme de mort cellulaire morphologiquement, biochimiquement et moléculairement différente de la nécrose, seule forme de mort cellulaire connue jusqu'alors [43]. "Apoptose" est un nom qui signifie

" chute » en grec ancien et qui évoque la chute des feuilles caduques en automne. L'apoptose est un processus actif et physiologique de mort cellulaire, utilisé pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées, potentiellement dangereuses pour l'organisme.

Le programme de mort cellulaire, qui est alors activé par la cellule elle-même, joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme. L'exécution de ce programme fait appel à de nombreux facteurs moléculaires qui vont réguler l'apoptose tout au long de son déroulement. Ils ont été identifiés à partir des travaux de Horvitz et al. [44] sur le développement du nématode *Caenorhabditis elegans* au cours duquel une partie des cellules meurt par apoptose. Ces facteurs moléculaires sont responsables de l'apparition de phénotypes morphologiques et biochimiques nouveaux qui sont caractéristiques de cellules en apoptose.

Des dérégulations du programme apoptotique sont également à l'origine de perturbations dans le développement de l'organisme et peuvent être à l'origine de nombreuses pathologies graves.

2. Rôle physiologique.

Au cours de l'embryogenèse, de nombreuses structures mises en place initialement pendant le développement embryonnaire sont ensuite détruites par apoptose. C'est le cas du canal de Müller détruit chez l'homme, du canal de Wolff détruit chez la femme ainsi que les tubules pronéphriques utilisés par les amphibiens et les poissons mais détruits chez les mammifères. L'apoptose intervient également dans la morphogenèse des doigts où les cellules de l'espace interdigital (doigts des mains et des pieds palmés) disparaissent par apoptose [45].

La mise en place des systèmes nerveux et immunitaire fait aussi appel à l'apoptose, en permettant l'apport du nombre physiologique de cellules souches nécessaires. Pendant le développement embryonnaire, les neurones sont générés en excès et les cellules surnuméraires vont ensuite mourir par apoptose permettant un équilibre entre les neurones et les cellules cibles des neurones [46]. Seuls vont survivre les neurones qui se connecteront correctement à leur cible, les autres mourront par apoptose.

3. Caractéristiques des cellules apoptotiques.

Lors de l'apoptose, une série d'évènements moléculaires et biochimiques conduit à des altérations morphologiques caractéristiques des cellules (Figs. 10 et 11), permettant leur identification.

Un des premiers phénomènes observables est la réduction du volume cellulaire par déshydratation des cellules : perte de l'eau intracellulaire qui conduit à la condensation du

cytoplasme. Malgré la rétractation cellulaire progressive, les organites intracellulaires restent intacts (Fig. 10) et gardent leur aspect normal jusqu'à la phase terminale de l'apoptose [47].

Le noyau présente lui aussi des modifications : on assiste à une condensation de la chromatine qui débute à la périphérie de la membrane nucléaire. Puis, cette enveloppe nucléaire se désintègre et la chromatine se fragmente en petites masses distinctes. Le bourgeonnement de la membrane plasmique conduit à la formation de corps apoptotiques (Fig. 10), évitant au contenu cellulaire de se répandre dans l'espace intercellulaire [48]. Les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés *in vivo*, par les cellules voisines ou les macrophages, sans provoquer de réaction inflammatoire dans les tissus [48].

Parallèlement à ces modifications morphologiques, surviennent des altérations biochimiques spécifiques au cours de l'apoptose. Une des modifications majeures est la fragmentation de l'ADN survenant lors de la condensation de la chromatine sur les histones formant les nucléosomes. Cette fragmentation résulte de l'activation d'une endonucléase qui coupe l'ADN entre les nucléosomes et conduit à l'apparition de fragments d'ADN de taille équivalente à des multiples de 180 paires de bases (Fig. 11) [48].

Sur le plan biochimique, l'apoptose est aussi caractérisée par la perte de l'asymétrie des phospholipides de la membrane plasmique. Les phosphatidylsérines normalement présentes au sein du feuillet interne de la bicouche lipidique membranaire vont être externalisées à la surface des cellules. Les cellules apoptotiques ainsi modifiées sont alors reconnues comme cibles par les macrophages et phagocytées [49]. De plus, lors de l'apoptose, certaines protéines telle que les lamines sont clivées, entraînant une altération du cytosquelette et conduit à la formation de corps apoptotiques.

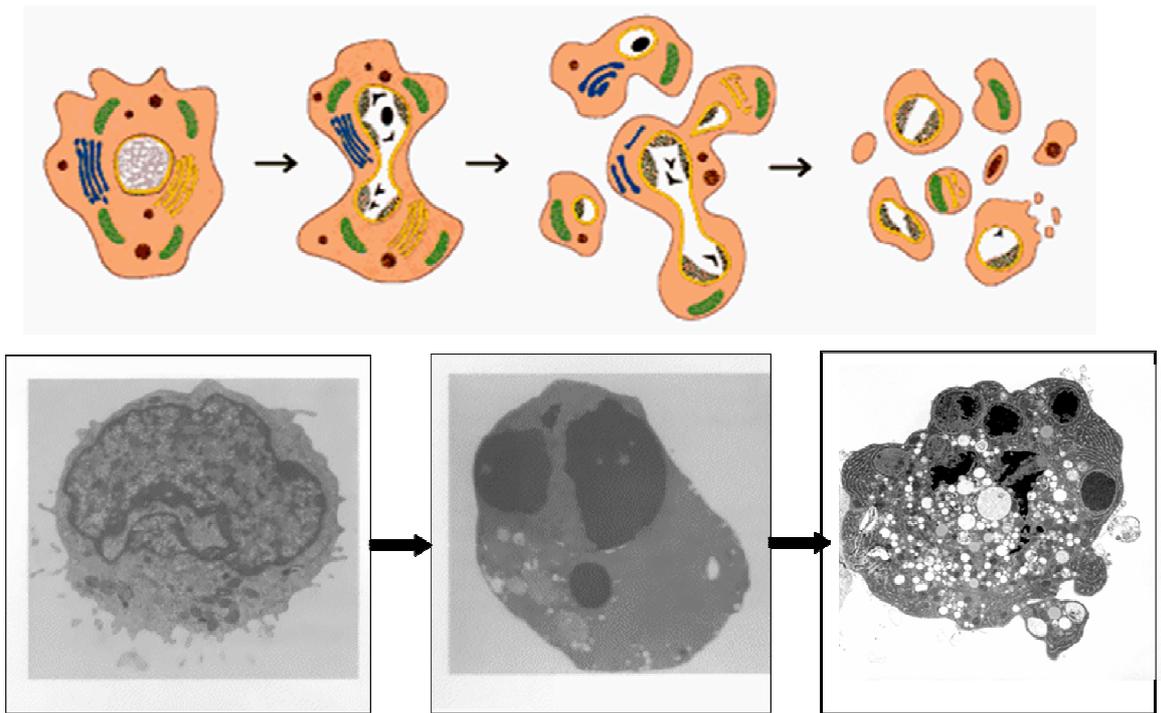
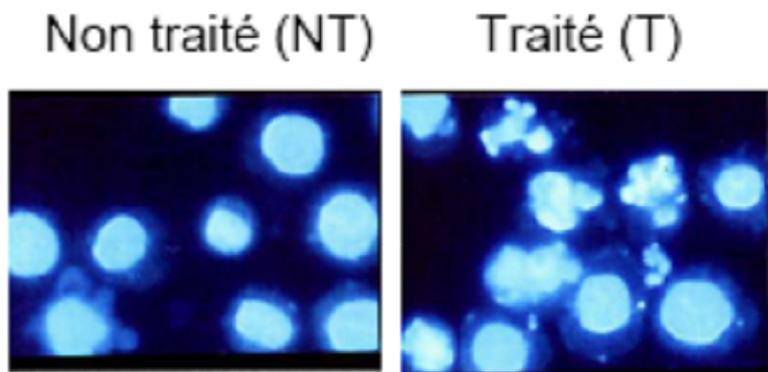


Figure 10 : description schématique et microscopique des modifications morphologiques intra-cellulaires qui surviennent au cours de l'apoptose. De la cellule viable (gauche) à la formation des corps apoptotiques (droite).

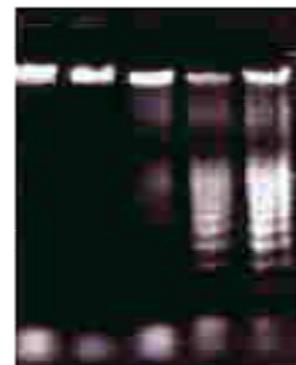
A



Condensation de la chromatine

B

NT T1 T2 T3 T4



Fragmentation de l'ADN

Figure 11 : détection de la condensation de l'ADN par DAPI (A) et de sa fragmentation par électrophorèse sur gel d'agarose (B).

4. Les voies d'induction de l'apoptose.

L'apoptose peut classiquement être divisée en 3 phases : une phase d'induction ou d'initiation, une phase d'exécution et une phase de dégradation. La phase d'initiation de l'apoptose est un phénomène réversible au cours duquel le signal apoptotique (intra- ou extra-cellulaire) est transmis à des protéines initiatrices, les caspases, par des molécules adaptatrices [50]. Les caspases sont des enzymes qui possèdent un résidu cystéine dans leurs sites actifs et clivent leurs substrats après un résidu aspartate, ce qui leur a valu le nom de caspases (Cystéyl ASPartylprotéASES). Ces protéases interviennent dans l'exécution de l'apoptose et conduiront à la dégradation de la cellule.

Il existe 2 voies principales d'induction de l'apoptose :

- la voie des récepteurs de mort (ou voie extrinsèque),
- la voie mitochondriale (ou voie intrinsèque).

L'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose se fait en réponse à la fixation de ligands spécifiques de type cytokines sur des récepteurs de surface appelés récepteur de mort (Fig. 12). Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs au " Tumor Necrosis Factor » (TNFR) et incluent des récepteurs tels que le récepteur Fas (CD 95/APO-1) [51]. Au sein de notre équipe d'accueil, (EA 3842, homéostasie cellulaire et pathologies), le récepteur Fas a été très étudié puisqu'il est impliqué dans de nombreux processus de neuro-oncologie [52-55].

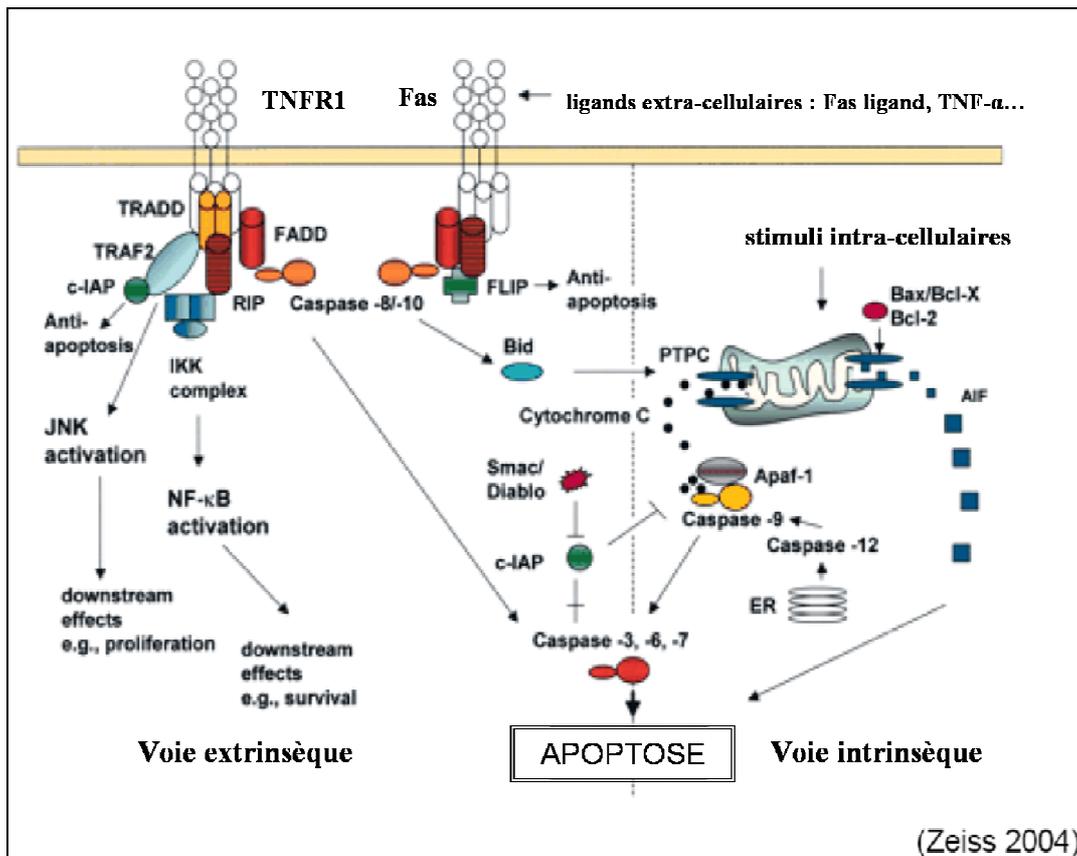


Figure 12 : voies d'induction de l'apoptose par les récepteurs de mort [50].

4.1. Généralité sur le récepteur Fas.

Le récepteur Fas est une protéine classée dans la superfamille des récepteurs au TNF / NGF, " Nerve Growth Factor » (NGF) qui comportent tous, dans leur partie extracellulaire, plusieurs domaines riches en cystéines ou " Cystein Rich Domain » (CRD) (de 2 à 5 domaines) (Fig. 13). Parmi ces récepteurs, le récepteur Fas a été largement étudié et décrit. Ce récepteur de mort présente un " Death Domain » (DD) ou domaine de mort intracellulaire, dont la présence est indispensable lors de l'induction du signal pro-apoptotique. Ainsi, il induit la mort cellulaire, notamment lors de l'élimination de cellules surnuméraires ou potentiellement dangereuses (délétion des clones lymphocytaires auto-réactifs lors de la lymphogenèse, éradication de cellules cancéreuses). Il a récemment été montré que le récepteur Fas possède également des propriétés non apoptotiques, lui procurant donc une dualité fonctionnelle. Fas est non seulement impliqué dans la prolifération, la différenciation cellulaire et la neuritogenèse mais il pourrait également faciliter la progression des tumeurs et l'angiogenèse [56].

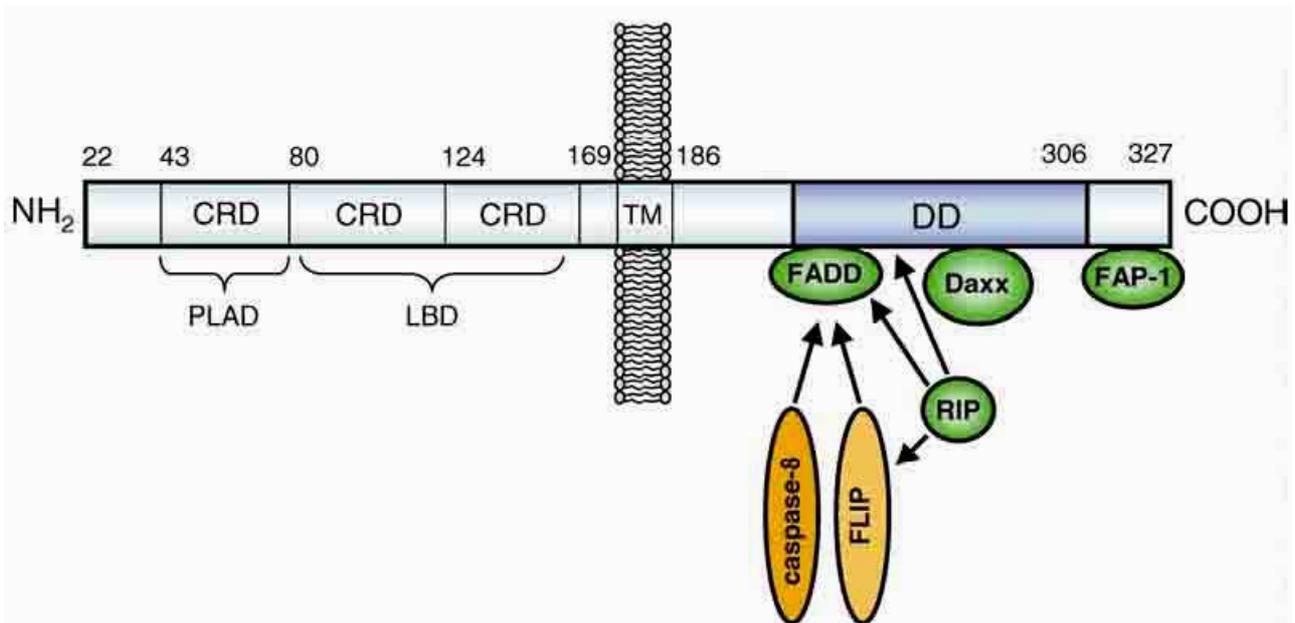


Figure 13 : composition du récepteur Fas. (d'après Lambert et al. 2003 [57]). CRD : domaine riche en cystéine ; PLAD : domaine de pré-association ; LBD : domaine de liaison du ligand ; TM : domaine transmembranaire ; DD : domaine de mort.

4.1.1. Structure de la protéine Fas.

Fas est une protéine composée de 335 acides aminés. En fonction des études publiées, le poids moléculaire de ce récepteur varie de 45 à 52 kDa [58], cette variation étant très certainement liée à l'existence de formes différemment glycosylées du récepteur [59]. D'autre part, des études ont mis en évidence qu'un épissage alternatif du transcrite de Fas entraîne l'excision des régions codant le domaine transmembranaire, ce qui permet la production de formes solubles du récepteur contribuant à la régulation de l'apoptose induite par Fas Ligand ou Fas L [60].

a) Partie extracellulaire.

Les 156 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de Fas correspondent à la partie extracellulaire du récepteur (Fig. 13). Ils sont organisés de sorte à former 3 CRD : acides aminés 28 à 65 pour le CRD1, 65 à 112 pour le CRD2 et 112 à 149 pour le CRD3. Des études de mutagenèse permettant de tronquer différents peptides dans la partie extracellulaire ont permis d'identifier la zone de fixation du ligand de Fas. Cette zone correspond aux domaines CRD2 et CRD3, les plus proches de la région transmembranaire du récepteur et est appelée "ligand binding domain" (LBD) ou domaines de liaison du ligand. Le domaine CRD1 a quant à lui été plus récemment décrit comme une zone permettant l'oligomérisation du récepteur, indispensable à la

transduction du signal apoptotique de Fas [60]. Cette oligomérisation, qui s'est révélée indépendante du ligand, est réalisée grâce aux 65 acides aminés N-terminaux de la protéine qui forment un domaine d'auto-association ou PLAD ("pre-ligand association domain") [61] (Fig. 13).

b) Partie intracellulaire.

L'étude de la séquence en acides aminés de la partie intracellulaire du récepteur Fas n'a mis en évidence aucune séquence consensus correspondant à une quelconque activité enzymatique [62]. En revanche, les 15 derniers acides aminés de la partie C-terminale de Fas déterminent une zone d'interaction avec la protéine tyrosine phosphatase : Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1); (Fig. 13) dont le rôle est de réguler négativement l'apoptose médiée par le récepteur Fas [63]. La délétion de ces 15 résidus N-terminaux entraîne une augmentation de l'apoptose transmise par Fas [64]. Le domaine DD du récepteur Fas comporte également des zones d'interaction avec deux molécules adaptatrices, "Fas associated death domaine" (FADD) et Daxx, qui permettent d'activer les voies de signalisation intracellulaires (Fig. 13). Enfin, la séquence de la partie intracellulaire du récepteur Fas comporte un site de phosphorylation, en dehors du DD, au niveau de la zone proximale [65].

4.2. Voies d'induction du récepteur Fas.

4.2.1. *Voie apoptotique.*

Lorsqu'un trimère de Fas L se fixe sur un trimère de Fas, on observe la formation du complexe de signalisation de mort induite, « Death Induced Signaling Complex » (DISC). Le récepteur Fas stimulé, qui ne possède aucune activité enzymatique intrinsèque, doit impérativement s'associer à diverses protéines capables de transmettre le signal de mort. Ainsi, la transmission du signal apoptotique de Fas nécessite la formation d'un complexe multiprotéique, le DISC, composé d'agrégats de Fas, de la protéine FADD et de la caspase-8 (Fig. 14).

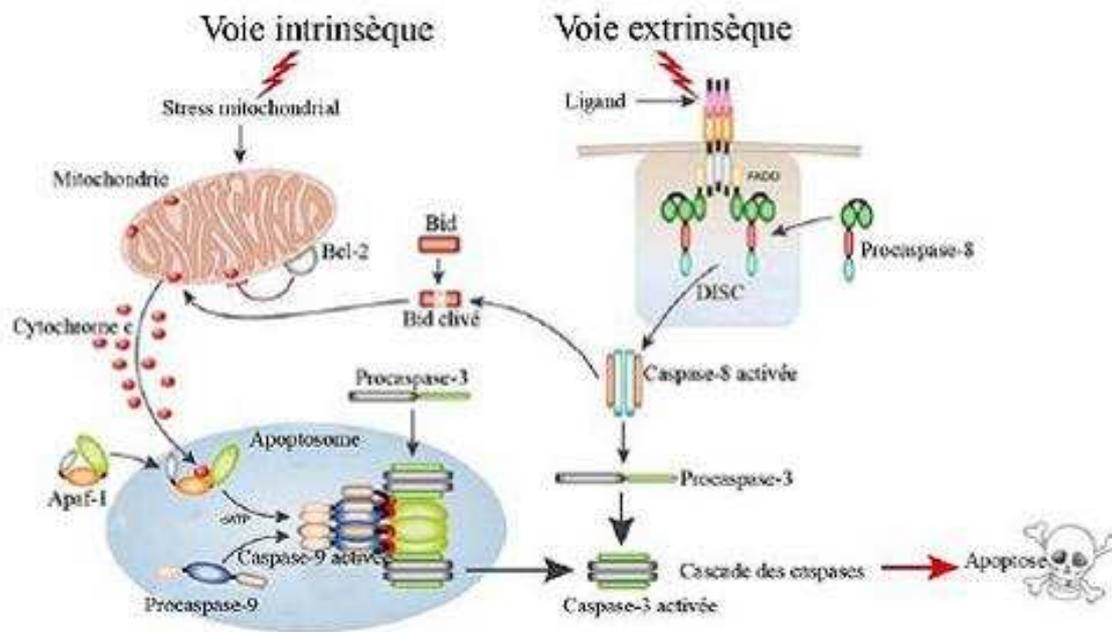


Figure 14 : représentation des voies extrinsèque et intrinsèque induites par la caspase-8. Les deux voies pro-apoptotiques peuvent se rejoindre par l'intermédiaire du clivage de Bid. (D'après Macfarlane et Williams, 2004 [66]).

4.2.2. Voie proliférative.

A l'opposé de la voie conduisant à la mort cellulaire, l'activation du récepteur Fas peut également déclencher la prolifération de différents types cellulaires. Ce phénomène a notamment été décrit pour des cellules T stimulées par leur récepteur, des thymocytes humains purifiés [67] ou encore des fibroblastes humains de peau, pour lesquels la simple stimulation de Fas suffit à entraîner une prolifération significative [68, 69]. A l'heure actuelle, même si les voies de signalisation empruntées restent à déterminer entièrement, il semble que les protéines FADD, FLIP, la caspase-8 et la voie des " extracellular signal-regulated kinases " (ERK) soient impliquées dans cette prolifération cellulaire en réponse à la stimulation de Fas [53, 65, 70-72].

Ainsi, le récepteur Fas présente une dualité fonctionnelle puisque son activation entraîne deux types de signalisation antagonistes : mort cellulaire ou prolifération. Parmi les différents facteurs pouvant contribuer à diriger de façon préférentielle vers la prolifération et la survie, les facteurs de croissance et les cytokines présents dans l'environnement cellulaire jouent un rôle prépondérant dans l'orientation de la réponse [73]. Ainsi, des travaux récents de notre équipe ont

mis en évidence que l'inhibition de la voie apoptotique de Fas pouvait être induite par l'activation d'un autre récepteur de mort, le récepteur de faible affinité pour les neurotrophines (p75^{NTR}). Cette interaction a été détectée au niveau de cellules neuroblastiques humaines (lignée SH-SY5Y), co-exprimant les deux récepteurs, et dans lesquelles la co-stimulation de Fas et p75^{NTR} aboutit à une inhibition du signal apoptotique, alors que l'activation isolée de chaque récepteur induit l'apoptose [53]. Cette survie cellulaire est associée à l'activation de la caspase-8 et pourrait faire intervenir des protéines adaptatrices au sein d'un complexe de signalisation [53].

4.3. Rôles physiologiques et pathologiques.

Le récepteur de mort Fas a initialement été identifié à la surface cellulaire de lymphocytes B et de fibroblastes humains [74, 75]. Ultérieurement, des études ont montré que Fas est exprimé de façon physiologique et constitutive à la surface de nombreux types cellulaires : lymphocytes B et T activés, hépatocytes, cellules épithéliales du côlon [76] et de l'endomètre utérin [77], cellules myocardiques [78] ou encore cellules endothéliales [79]. Il est également largement exprimé au niveau des cellules du système nerveux, que ce soit au niveau de neurones (corticaux, sensoriels, hippocampiques ou motoneurones) ou au niveau de cellules gliales (oligodendrocytes, astrocytes, cellules microgliales et cellules de Schwann) [57, 80]. Malgré cette expression ubiquitaire, les seules conséquences directes de l'inactivation du récepteur Fas décrites à l'heure actuelle chez l'homme ne concernent que les cellules du système immunitaire [81].

4.3.1. Rôle dans le système immunitaire.

En plus de son implication dans le maintien de l'homéostasie des populations lymphocytaires, le récepteur Fas joue un rôle capital dans l'élimination des cellules tumorales, ou infectées par un virus par les cellules du système immunitaire. En effet, ces cellules tumorales ou infectées sont normalement éliminées par les cellules T cytotoxiques activées par le mécanisme suivant : ces lymphocytes T expriment Fas L à leur surface, ce qui leur permet d'induire le suicide des cellules infectées ou en voie de tumorigenèse exprimant physiologiquement le récepteur Fas (Fig. 15) [38, 82, 83].

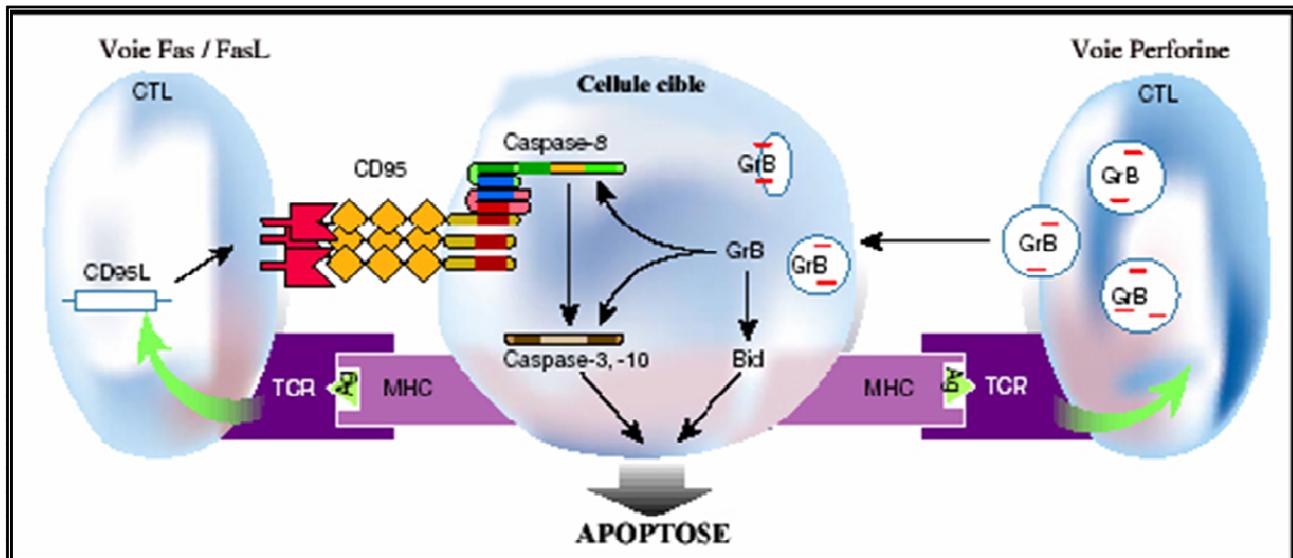


Figure 15 : Elimination des cellules pathogènes par les lymphocytes T CD8+ [84].

Néanmoins, un grand nombre de cellules tumorales parvient à échapper à cette apoptose induite par les cellules T cytotoxiques, grâce à deux grands types de mécanismes : i) inhibition de l'expression de Fas à leur membrane [85] ou inactivation de Fas par des mutations ponctuelles, décrites tant au niveau des tumeurs solides [86, 87], que des hémopathies [86, 88, 89]; ii) expression du ligand de Fas, et de Fas L, par les cellules tumorales [90], afin de déclencher l'apoptose des lymphocytes activés exprimant Fas. Ce dernier mécanisme est similaire à celui qui est observé au niveau des organes dits " privilégiés » (cellules de la cornée, cellules de Sertoli du testicule, microglie du système nerveux et placenta), il est assimilable à une barrière tissulaire physiologique contre les réponses du système immunitaire [38].

4.3.2. Rôle dans le système nerveux.

L'apoptose constitue également un mécanisme physiologique crucial au cours de la formation du système nerveux embryonnaire, puisqu'elle permet l'élimination des neurones surnuméraires n'établissant pas de connexions synaptiques fonctionnelles [91]. En revanche, chez l'adulte, une augmentation de l'apoptose neuronale est impliquée dans différentes maladies neurodégénératives telles que la sclérose latérale amyotrophique, la maladie d'Alzheimer ou encore lors des accidents vasculaires cérébraux ischémiques [66, 92, 93].

a) Fas et neurones.

Bien que la voie du récepteur Fas soit la principale voie d'apoptose décrite dans de nombreux systèmes, l'expression de Fas par les neurones reste très peu documentée. Son expression par les neurones a été mise en évidence dans différentes conditions pathologiques, expérimentales ou non. Ainsi, le récepteur a été détecté dans les neurones de rats au cours de l'ischémie expérimentale [94].

D'autre part, Fas est exprimé par les neurones dans des conditions pathologiques, comme la maladie d'Alzheimer [92], ou après exposition à l'interféron gamma (IFN- γ) [95]. De plus, *in vitro*, les motoneurones embryonnaires de rat co-expriment Fas et Fas L et rentrent rapidement en apoptose par la voie de Fas lorsqu'ils sont cultivés en absence de facteur trophique [96] alors que Fas est présent sur des motoneurones de souris cultivés sans privation de sérum et par conséquent de facteurs trophiques [97]. Ainsi, le récepteur Fas n'est pas seulement exprimé par les neurones dans des conditions pathologiques mais également dans certaines conditions physiologiques normales. En effet, Fas est exprimé transitoirement par des neuroblastes dans le cortex de rats et de façon plus importante à des stades plus différenciés dans des cultures primaires de neurones de souris [80]. Des études immunohistochimiques réalisées *ex-vivo* ont permis de détecter l'expression neuronale de Fas dans le cerveau de souris juvéniles normales, mais cependant sans identification précise de la population neuronale impliquée [98].

En revanche, le récepteur Fas n'est pas détectable dans des cultures de cellules issues de cerveaux de fœtus humains à 12-16 semaines de gestation [99], alors que des travaux réalisés dans notre équipe ont montré que Fas est exprimé constitutivement uniquement par les motoneurones humains foetaux en culture et sur coupes *ex vivo* [52].

De plus, des études récentes semblent montrer que les fonctions non apoptotiques de Fas joueraient également un rôle important dans le système nerveux. En effet, les souris *lpr* (déficiante en Fas) présentent, en plus de leurs désordres immunitaires, une atrophie progressive des dendrites des neurones pyramidaux du SNC [100]. D'autre part, l'étude plus récente de la lignée neuroblastique humaine SH-SY5Y et de cultures primaires de neurones sensitifs de souris a mis en évidence que l'activation du récepteur Fas induisait la croissance neuritique, par une voie indépendante de la caspase-8 et liée à l'activation des ERK [56]. En effet, on a observé que FasL entraînait une augmentation de la croissance dendritique, *in vivo* et *in vitro*, sur les cellules neuronales hippocampiques et corticales et en aucun cas l'apoptose de ces cellules neuronales. Cette arborisation des cellules neuronales par l'interaction Fas / Fas L ne semble pas passer par la voie des caspases mais semble lié au DD (Fig. 13) et corrélé avec une augmentation de l'expression de la

protéine Tau non phosphorylée. Dans ce cadre, Fas permettrait la croissance dendritique en agissant sur la phosphorylation de Tau qui, par son interaction avec le cytosquelette, permettrait les modifications structurelles nécessaires à la croissance dendritique [101].

b) Fas et cellules neuroblastiques.

La méthylation des gènes de l'apoptose dans les tumeurs ainsi que des modifications épigénétiques participent au développement des cancers humains, au même titre que les mutations géniques. La plus étudiée est la méthylation des îlots CpG (région riche en dinucléotides cytosine-guanine) de la région promotrice de certains gènes [102]. Cette méthylation permet le recrutement d'une histone désacétylase qui inhibe l'expression génique. Parmi les gènes sensibles à cette méthylation se trouvent plusieurs gènes dont le produit est impliqué dans le contrôle de la mort cellulaire par apoptose. C'est ainsi que la diminution de l'expression de la caspase-8 dans les neuroblastomes agressifs, des tumeurs du système nerveux périphérique observées chez l'enfant, est due le plus souvent à l'hyperméthylation du promoteur du gène correspondant [103]. Cette disparition de la caspase-8 confère alors aux cellules malignes une résistance à l'apoptose induite par l'activation d'un récepteur à domaine de mort comme Fas ou TNF-R1. Une des conséquences, en est la résistance accrue à l'action des cellules T cytotoxiques et aux agents anti-cancéreux utilisant la voie de Fas pour induire la mort cellulaire. La réintroduction de la caspase-8 dans ces cellules restaure la sensibilité à l'apoptose. La méthylation du gène *CASP-8* est associée à l'amplification de *MYCN*, un homologue fonctionnel de *c-MYC*. Les deux anomalies ont un effet opposé sur la mort apoptotique : la surexpression de *MYCN* sensibilise les cellules de neuroblastome à l'apoptose induite par divers stimuli, un effet que corrige la méthylation du gène *CASP-8* qui pourrait ainsi participer à la tumorigenèse [104]. L'expression du gène *Apaf-1* est également dérégulée par l'hyperméthylation de son promoteur. Cette modification a été identifiée dans les mélanomes malins métastatiques [105].

4.4. Rôle de Fas dans les thérapeutiques anti-cancéreuses.

Dans la littérature, de nombreux articles traitent de la sensibilisation des cellules au ligand Fas L à la suite à l'exposition de celles-ci aux molécules utilisées en chimiothérapie [106-109]. Des traitements avec des molécules anti-cancéreuses comme le méthotrexate, le cisplatine, la mytomycine ou la doxorubicine, ou encore l'étoposide, entraîneraient une augmentation de l'expression du récepteur Fas ainsi que de son ligand Fas L dans de nombreux cancers. De ce fait, les cellules seraient d'autant plus sensibles à l'apoptose induite par la voie de Fas [110, 111].

D'autres mécanismes de sensibilisation à l'apoptose induite par Fas au cours de traitements anti-cancéreux ont été mis en évidence et notamment l'augmentation de l'expression de la caspase-8 ainsi que de FADD [106]. Récemment, il a été démontré que certaines molécules comme le taxol augmentaient le taux d'apoptose par l'activation des caspases -8 et -10 via leur activation par FADD [112]. La perte de fonction du récepteur Fas est souvent liée à des processus de cancérisation.

D'autre part, Fas L peut être utilisé à des fins thérapeutiques. Du surnageant de culture de neuroblastomes transfectés par le gène codant pour la protéine Fas L a été utilisé pour induire l'apoptose de cellules cibles (tumeur *in vivo*) [113]. L'efficacité de la voie de Fas pour l'activation de l'apoptose dans les tumeurs, a été démontrée *in vivo* par transplantations de tumeurs solides sur la souris. L'apoptose ayant été induite, dans cette étude, par un anticorps anti-Fas agoniste, des cellules exprimant Fas L ou encore des protéines recombinantes (rFas L) [114]. Néanmoins, l'induction d'une réponse inflammatoire par Fas L pourrait faciliter l'expansion tumorale [114] ou induire des hépatites fulminantes [115, 116]. Des voies de recherche thérapeutique s'orientent vers des injections locales de Fas L ou l'utilisation de vecteurs inductibles permettant une expression régulée de Fas L [117].

5. Pathologies et dérégulations.

Le dérèglement des mécanismes de régulation de l'apoptose est impliqué dans la physiopathologie de nombreuses maladies impliquant un défaut (cancers) ou un excès (maladies neurodégénératives) de mort cellulaire programmée (Fig.16).

L'excès d'apoptose intervient dans la mise en place d'anomalies congénitales du développement et de certaines maladies neurodégénératives [93] chroniques comme l'amyotrophie spinale, la sclérose latérale amyotrophique, la chorée de Huntington, la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson. De plus, cet excès d'apoptose est à l'origine de certaines pathologies provoquées par des infections virales comme le S.I.D.A. (Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise) dans lequel le V.I.H. (Virus de l'Immunodéficience Humaine) induit l'apoptose des lymphocytes T auxiliaires nécessaires pour activer les lymphocytes T cytotoxiques [118, 119].

A l'inverse, un défaut d'apoptose a été observé dans le développement de maladies auto-immunes et entraîne l'apparition de lymphocytes auto-réactifs qui n'ont pas été éliminés par apoptose au cours de la sélection clonale lymphocytaire. De même, un défaut ou un blocage dans l'exécution de l'apoptose ont pu être identifiés dans certaines pathologies virales, des syndromes lymphoprolifératifs et surtout dans de nombreux types de cancers [118, 119].

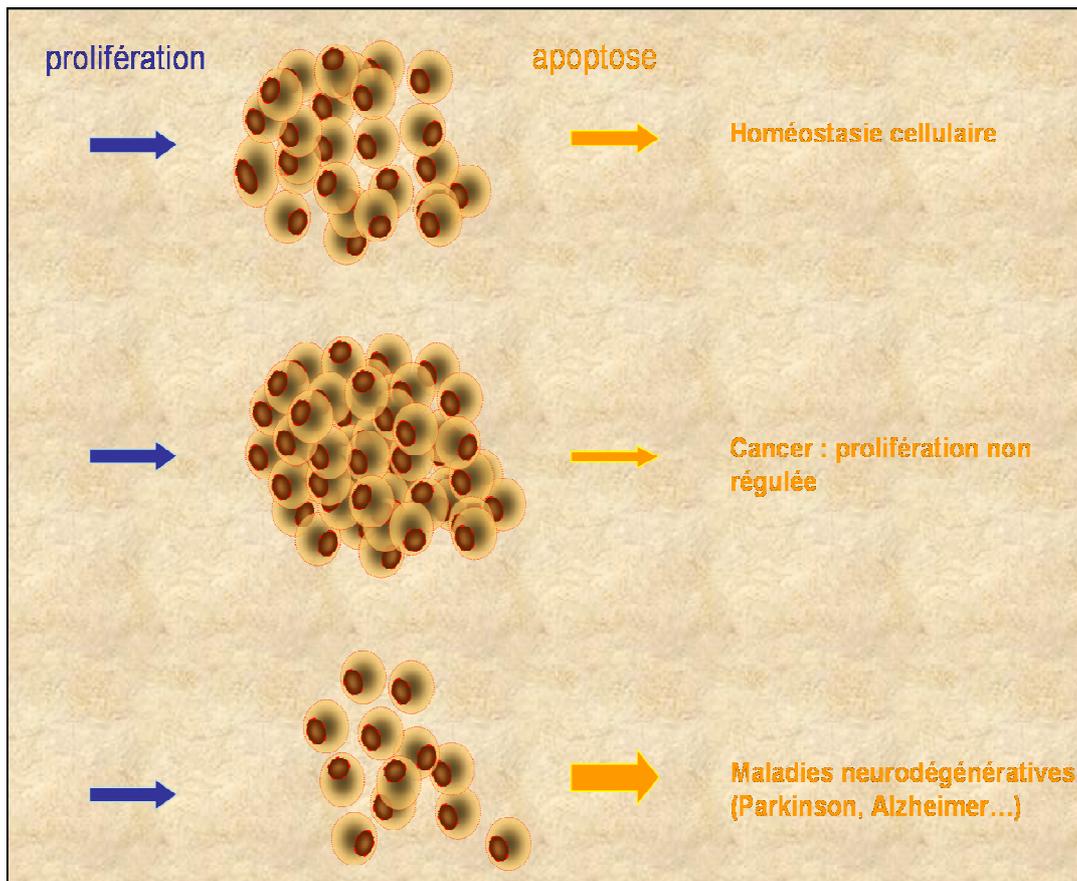


Figure 16 : schéma simplifié d'implication du dérèglement de l'apoptose dans certaines pathologies telles que le cancer.

Au cours de ce travail, nous avons mis en œuvre comme modèle d'étude, l'induction de l'apoptose par la diosgénine (stéroïde végétal) dans la lignée d'ostéosarcome humain 1547.

6. Généralités sur les ostéosarcomes.

L'ostéosarcome se définit comme une tumeur primitive de l'os caractérisée par la production anormale de tissu osseux (ostéogénèse). C'est une tumeur rare (0,5 % environ des cancers) qui survient principalement à l'adolescence ou qui complique, chez l'adulte âgé, la maladie osseuse de Paget [120].

6.1. Symptômes.

Généralement la tumeur se développe sur la partie moyenne des os longs, au voisinage d'une articulation, principalement le genou ou l'épaule (Fig. 17). Dans ce cas, ce sont le fémur, le tibia et l'humérus qui sont atteints par la tumeur. L'ostéosarcome a tendance à s'étendre relativement rapidement aux tissus osseux voisins, en détruisant ceux-ci. Les jeunes patients présentent une tuméfaction (augmentation de volume) apparaissant localement et s'accompagnant d'une inflammation associée à une douleur.



Figure 17 : coupe anatomique d'un os atteint d'ostéosarcome (Faculté Necker Enfants-Malades, Travaux Pratiques d'Anatomie pathologique).

Une fracture inexplicée est quelquefois le seul symptôme révélant l'ostéosarcome. Il s'agit d'une fracture pathologique, c'est-à-dire survenant spontanément ou après un choc minime. La maladie se révèle également par des douleurs, souvent rapportées à un choc, mais qui s'accroissent, persistent au repos, en particulier la nuit, et s'accompagnent d'une tuméfaction.

6.2. Le diagnostic.

L'approche diagnostique est statistique, réunissant de nombreux éléments pour aboutir à une probabilité [121]. L'âge est fondamental. Avant 5 ans une tumeur maligne est presque toujours une métastase de neuroblastome, entre 5 et 15 ans un ostéosarcome ou un sarcome d'Ewing [122], après 40 ans une métastase ou un myélome.

Le diagnostic est évoqué dès l'examen des radiographies [122] de l'os atteint, mais une analyse microscopique (anatomo-pathologique) d'un fragment obtenu par biopsie est indispensable (Fig. 18).

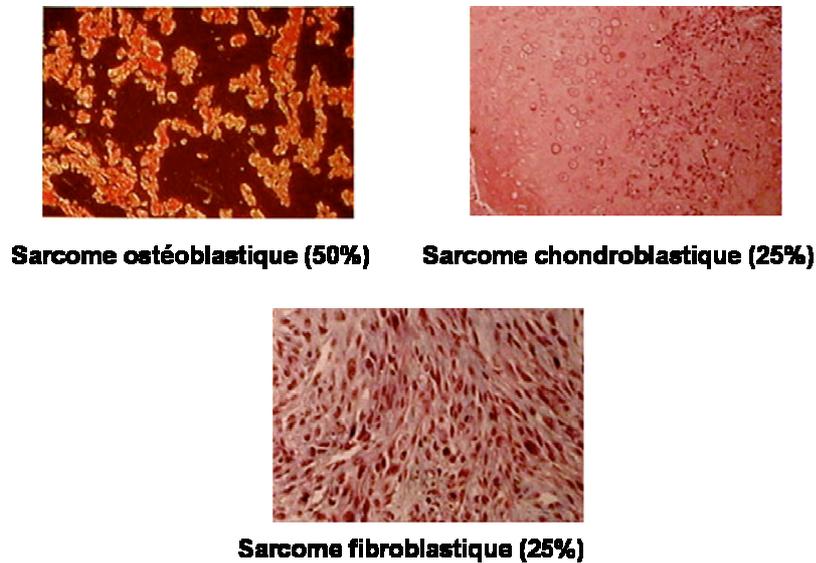


Figure 18 : anatomie pathologique des ostéosarcomes.

Les techniques d'imagerie des os se sont beaucoup modernisées depuis une dizaine d'années. Au cliché radiologique standard [122] qui reste la base indispensable, à la scintigraphie osseuse et à l'artériographie, se sont ajoutées l'échographie et surtout la tomодensitométrie (scanner), ainsi que l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

6.3. L'étiologie.

Sa cause est inconnue mais elle est favorisée par une irradiation [123]. L'ostéosarcome est relativement plus fréquent chez les patients guéris d'un rétinoblastome ou d'un sarcome d'Ewing [124] et s'associe parfois à des altérations des gènes suppresseurs *Rb* ou *p53*, ce qui suggère l'intervention de facteurs génétiques. La maladie osseuse de Paget, faisant intervenir un processus cancéreux, semble également être une des causes de survenue d'ostéosarcome.

6.4. Classification des ostéosarcomes.

On décrit habituellement trois types d'ostéosarcome [125] selon le point de départ de la tumeur :

- Ostéosarcome central ou **myélogène** dû au développement anarchique des cellules de la moelle osseuse ;
- Ostéosarcome périphérique ou **périostéal** qui se développe à partir des diaphyses (partie moyenne des os) et de la face profonde du périoste ;
- Ostéosarcome **parostéal** dont la source se situe à la face externe du périoste (membrane fibreuse située à la périphérie de l'os, participant à sa croissance et à sa vascularisation).

Une autre classification de l'ostéosarcome est élaborée en fonction de la tendance destructrice ou constructive de la tumeur. C'est ainsi que l'on décrit des sarcomes ostéolytiques ou ossifiants. Les équipes médicales spécialisées en orthopédie préfèrent classer les ostéosarcomes en groupes :

- Le groupe I comprend le sarcome ostéoblastique.
- Le groupe II comprend les sarcomes à tendance ostéoïde mais dont la structure est composée également de tissus chondroïde (ayant l'aspect du cartilage) ou anaplasique. Ce type de sarcome est plus fréquent et son évolution plus péjorative.
- Le groupe III comprend les formes anaplasiques dont l'évolution est sévère.
- Le groupe IV comprend les formes particulières c'est-à-dire les ostéosarcomes ostéoblastiques particulièrement différenciés.

6.5. Evolution de la maladie.

L'évolution spontanée des ostéosarcomes est caractérisée par une progression locale rapide qui fragilise l'os et envahit les muscles, vaisseaux, nerfs et articulations voisines. Mais le risque vital vient des métastases fréquentes et précoces, en particulier aux poumons, qui étaient responsables d'une mortalité supérieure à 80 % dans les trois ans suivant le diagnostic [123].

Depuis le milieu des années 1970, le pronostic de ces tumeurs a été profondément modifié par la mise au point progressive de chimiothérapies [126] générales efficaces sur les métastases.

6.6. Traitement.

La majorité des tumeurs malignes primitives de l'os reçoit une chimiothérapie avant exérèse. On peut ainsi obtenir une étude histologique de la tumeur, et apprécier l'efficacité du traitement. Celui-ci est poursuivi, s'il est efficace, en espérant qu'il le sera également sur les métastases. Dans le cas contraire, il est changé. L'imagerie essaie d'apporter la même information [127]. Sur les clichés standards et le scanner, la diminution de la taille de la tumeur, sa meilleure limitation et son ossification sont de bons indicateurs d'un traitement efficace [128]. La scanographie thoracique recherche une dissémination de la maladie dans les poumons. Enfin, le dosage des phosphatases alcalines dans le sang aide à suivre l'effet des traitements.

6.6.1. Ostéosarcome, non métastatique.

L'ostéosarcome non métastatique, est traité par une chimiothérapie [126] initiale qui a de nombreux avantages. Elle permet :

- d'effectuer précocement le traitement général préventif des métastases ;
- de diminuer la taille de la tumeur initiale, ce qui facilite une résection chirurgicale conservatrice ;
- d'évaluer la réponse histologique de la tumeur à la chimiothérapie. Cette réponse s'est révélée être l'un des facteurs pronostiques les plus importants chez les enfants ayant un ostéosarcome non métastatique. Les traitements associent le méthotrexate à haute dose, la doxorubicine, le cyclophosphamide, le cisplatine, l'ifosfamide et l'étoposide. Cette chimiothérapie initiale est suivie d'une chirurgie. Cette chirurgie évite l'amputation : on retire la tumeur ainsi que les tissus adjacents en passant à distance de la tumeur en tissu sain et en incluant le trajet de la biopsie.

6.6.2. Ostéosarcome métastatique.

Les ostéosarcomes métastatiques ne sont pas de bon pronostic. Ceci est modulé selon l'organe concerné et le nombre de métastases. Les patients avec des métastases osseuses présentent un mauvais pronostic. Ceci justifie une chimiothérapie initiale intensive et ce quel que soit le caractère extirpable ou non de l'atteinte tumorale. Cette chimiothérapie est suivie d'une chirurgie de la tumeur initiale et des métastases. On complète le traitement par une chimiothérapie complémentaire. Ces chimiothérapies comprennent le méthotrexate à haute dose, la doxorubicine, le cyclophosphamide, le cisplatine, l'ifosfamide et l'étoposide.

6.6.3. Récidives.

Les récurrences les plus fréquentes sont les métastases pulmonaires secondaires. Chaque fois que cela est possible, ces métastases sont retirées chirurgicalement avec ou sans chimiothérapie. Lorsque les métastases sont complètement retirées, les enfants peuvent guérir : les facteurs de meilleur pronostic sont un nombre de nodules pulmonaires inférieur à 4, des nodules localisés dans un seul poumon et un long délai entre la chirurgie initiale et la première récurrence.

Dans les autres situations (métastases extra pulmonaires, récurrence locale,...), le pronostic est plus sévère.

Le traitement dépend alors de la partie du corps concernée par la récurrence et du traitement déjà administré. L'ifosfamide seul ou en association avec l'étoposide, dans le cas où ils n'auraient pas été utilisés au préalable, sont efficaces chez 1/3 des patients.

7. Ostéosarcome et apoptose.

Induire l'apoptose est l'une des stratégies thérapeutiques employées pour lutter contre l'ostéosarcome. La diosgénine, stéroïde végétal induit l'apoptose *in vitro* des cellules d'une lignée d'ostéosarcome humain 1547 [129]. Dès 6 heures de traitement par la diosgénine 40 μM , apparaissent des figures apoptotiques : cellules adhérentes présentant des expansions cytoplasmiques ainsi que quelques cellules flottantes dont le cytoplasme est condensé. Ce phénomène biologique a été détecté par SdFFF alors que trop précoce pour être caractérisé par des techniques classiques utilisées en biologie cellulaire [130, 131] comme par exemple l'étude de la chute du potentiel mitochondrial...l'isolement de cette sous-population de cellules qui entrent en apoptose par SdFFF [32] pourrait permettre de comprendre par quels mécanismes la diosgénine induit l'apoptose et ce précocement.

7.1. Les stéroïdes végétaux

Différents travaux menés au sein de différents laboratoires à travers le monde ont démontré l'intérêt croissant pour les produits d'origine naturelle [132-137]. Ces études sont menées dans le but d'utiliser ces substances naturelles en thérapeutique pour diverses affections. Les premières hormones utilisées en thérapeutique ont été extraites d'organes animaux mais les quantités obtenues étaient faibles. La plus grande partie des hormones stéroïdiennes produites par l'industrie pharmaceutique sont maintenant obtenues par hémisynthèse à partir de substances naturelles : saponosides, phytostérols, cholestérol ou acides biliaires.

Les stéroïdes végétaux ont été étudiés dans le domaine biologique en raison de leur diversité structurale, de leurs activités biologiques (anti-cholestérolémique, anti-tumorale, anti-diabétique ou anti-inflammatoire) et de leur faible toxicité.

Parmi ces stéroïdes végétaux, les saponines sont particulièrement étudiées. Ce sont des hétérosides complexes composés d'une partie aglycone ou génine (sapogénine, partie non glucidique) et d'une ou plusieurs parties glucidiques. La partie aglycone est représentée par un noyau stéroïdique ou triterpénique et la ou les parties glucidiques sont composées d'oses simples comme le D-glucose ou le D-galactose.

Les saponines sont très fréquentes dans les végétaux supérieurs, surtout dans les tissus de réserve tels que les racines, les tubercules, les feuilles, les fleurs et les graines. On les trouve dans des légumes comme le soja, les pois, les épinards, les tomates, les pommes de terre et l'ail, et dans les herbes aromatiques comme le thé ou le ginseng.

Ce groupe de composés présente une grande diversité de structures et donc une grande variété de caractères biologiques. Plusieurs saponines ont été reconnues pour leur activité biologique et particulièrement pour leur activité anti-tumorale. En effet, des études menées sur les saponines triterpéniques de la famille des Avicines issues de l'acacia mûrier australien ont démontré que ces molécules présentent un effet inhibiteur sur le cancer de la peau chez la souris et sont capables d'induire l'apoptose et d'inhiber la croissance cellulaire [132, 133].

Les ginsenosides issus du ginseng présentent également des propriétés anti-prolifératives et pro-apoptotiques sur plusieurs types de cancers [135, 136].

Le guggulstérone est un composé extrait de la gomme guggul (*Commiphora mukul*) utilisée en médecine traditionnelle indienne. Il présente également des propriétés pro-apoptotiques sur des cellules cancéreuses [137, 138].

7.2. La diosgénine.

En 1939, la diosgénine, un précurseur de la D.H.E.A. (dehydroepiandrosterone), a été mise en évidence en quantité importante dans une dioscorée mexicaine. Ceci a permis le démarrage d'une production industrielle après la mise au point d'un processus de dégradation de ce précurseur. Le genre *Dioscorea* comprend environ 600 espèces souvent tropicales et la plupart de ces espèces ont un tubercule amylière à partir duquel la diosgénine est extraite. Dans les tubercules, la diosgénine existe sous la forme de dioscine et d'hétérosides voisins.

L'extraction débute par un traitement en milieu acide minéral qui provoque l'hydrolyse des hétérosides. Après filtration, la fraction insoluble est neutralisée, lavée et traitée par un solvant apolaire qui extrait la diosgénine. Actuellement, de nombreux pays tels que la Chine ou l'Inde produisent différentes espèces de dioscorées. La diosgénine est une sapogénine à noyau stéroïdique (Fig. 19). Cette molécule est constituée du noyau spirostane seul et ne présente pas de partie glucidique ramifiée en C3. La diosgénine est l'aglycone de la saponine appelée dioscine.

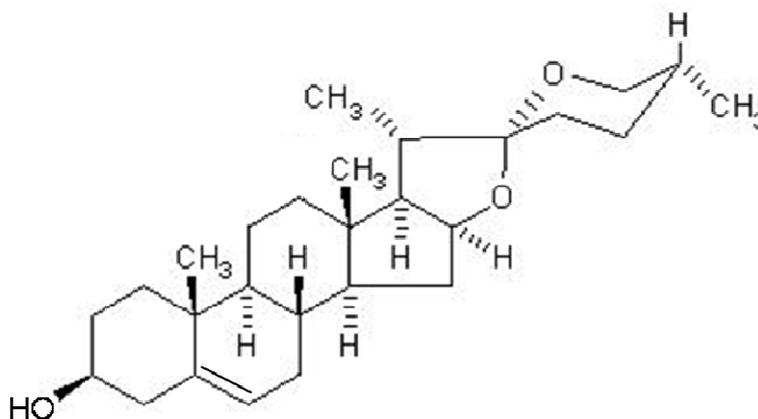


Figure 19 : la diosgénine : structure chimique.

On trouve la diosgénine en grande quantité dans les tubercules des plantes de la famille des Dioscorées telles que dans des plantes comme le fénugrec (*Trigonella foenum graecum*).

La diosgénine sert de base à l'hémisynthèse des hormones stéroïdiennes produites dans l'industrie pharmaceutique.

La diosgénine possède par ailleurs de nombreuses propriétés biologiques notamment anti-cholestérolémiques, anti-ostéoporose et anti-tumorales. En effet, la diosgénine est capable de moduler *in vivo* la sécrétion de cholestérol dans la bile [139]. L'effet de la diosgénine sur l'ostéoporose dans des modèles de rates adultes ovariectomisées montre qu'une supplémentation de cette molécule dans l'alimentation pourrait réduire significativement l'ostéoporose et entraîner une diminution de la taille des glandes surrénales [134, 140]. De plus, il a été récemment démontré que la diosgénine inhibait également l'ostéoclastogenèse, phénomène responsable de l'ostéolyse, ce qui expliquerait son effet contre l'ostéoporose [141]. La diosgénine possède également des propriétés angiogéniques. En effet, la diosgénine pourrait se lier au récepteur aux oestrogènes ER α dans les ostéoblastes et activerait alors la synthèse de VEGF (« Vascular Epidermal Growth Factor ») via l'activation du facteur de transcription HIF-1 α [142].

Enfin, des propriétés anti-prolifératives et pro-apoptotiques sur différentes lignées cancéreuses ont également été démontrées pour la diosgénine. Au sein du laboratoire de Biochimie de Monsieur Le Professeur Beneytout (Faculté de Pharmacie, Limoges, France), il a été démontré que la diosgénine induit un arrêt de la prolifération des cellules érythroleucémiques humaines (lignée HEL) associé à une différenciation mégacaryocytaire de ces cellules [143]. La diosgénine induit également l'apoptose de cellules issues de lignées d'ostéosarcome [129, 131], de mélanome et de laryngocarcinome [144]. La diosgénine agit sur le cycle cellulaire et sur l'activité cyclooxygénase dans la lignée 1547. Les résultats ont montré que le traitement par la diosgénine entraîne une inhibition de la prolifération corrélée avec une accumulation des cellules en G0 / G1 et une induction de l'apoptose. L'équipe de Monsieur Le Professeur Beneytout a montré qu'il existe une corrélation entre l'expression des ARNm de *p53*, de *p21 WAF1 / CIP1* et l'activation du facteur de transcription *NF-kappaB*, et a observé une augmentation couplée de la transcription du gène *hsp70* (protéine du stress) et du taux de PGE_2 [129]. Il a été montré également que la diosgénine induisait l'apoptose dans une lignée érythroleucémique humaine, les cellules K562 [145] et dans des cellules synoviales rhumatoïdes [146]. D'autres équipes ont également démontré que la diosgénine avait des effets chimiopréventifs *in vivo* dans le cas de cancer du côlon [147].

Les processus apoptotiques induits par la diosgénine font appel à des mécanismes complexes, non encore totalement élucidés, faisant intervenir sa fixation sur des récepteurs aux oestrogènes. Ces récepteurs sont internalisés dans la cellule et vont agir au niveau du noyau [142].

C. Différenciation

Dans le cadre des cancers, une autre notion à introduire est celle de différenciation. Les lignées cancéreuses comme celles issues de neuroblastomes sont des populations très complexes au sein desquelles plusieurs types ou phénotypes cellulaires sont présents. La présence de ces phénotypes, leur interaction et la cinétique de différenciation qui les lie ont été étudiées par SdFFF.

1. Généralités.

Toutes les cellules sont égales génétiquement, mais non dans leur phénotype. La différenciation consiste en une évolution de l'expression des gènes conduisant à de nouveaux phénotypes. Ainsi, le génome humain comprend environ 100 000 gènes, mais une cellule n'en exprime le plus souvent que 10 000. Les gènes exprimés par une cellule dépendent de son origine embryonnaire, du stade de développement de l'organisme, de l'environnement du tissu ou de la cellule et des fonctions à remplir [148].

La différenciation est en rapport avec les gènes qui répriment ou expriment d'autres gènes. Elle débute très tôt dans la vie embryonnaire : au début, les cellules se multiplient rapidement, puis elles commencent à se différencier et à migrer [40]. Cette différenciation est parfois contrôlée par des protéines particulières (onco-protéines plasmiques) qui ne seront plus exprimées après la naissance ou à l'âge adulte, mais pourront s'exprimer de nouveau en cas de cancer.

La différenciation terminale survient chez l'être développé et aboutit aux fonctions spécialisées. Certaines cellules, muscles, nerfs persistent pendant toute la vie de l'individu. D'autres au contraire, telles que les cellules épidermiques, de l'intestin... meurent rapidement après différenciation et doivent être renouvelées en permanence.

Les cellules différenciées ne se multiplient pas. A l'inverse, cellules souches et progéniteurs présentent à la fois des qualités de prolifération et de différenciation. Lorsque les processus de différenciation ne sont plus contrôlés, on obtient une prolifération anarchique de cellules peu ou pas différenciées à l'origine de la formation des tumeurs. Ainsi, quand on force une cellule différenciée (mature) à se multiplier par transfert d'un oncogène, les cellules se dédifférencient et se multiplient [149]. A l'inverse, certains agents permettent une différenciation des cellules cancéreuses qui stoppent leur multiplication. Il existe un certain antagonisme entre différenciation et multiplication cellulaire [149].

2. Neuroblastome.

Le neuroblastome est, après les tumeurs cérébrales, la tumeur solide (donc non hématologique) la plus fréquente de l'enfant. Le neuroblastome est une tumeur maligne issue des cellules embryonnaires participant à la formation du système nerveux sympathique (gouttières paravertébrales et ganglions sympathiques) et des médullosurrénales. Le neuroblastome est une tumeur originaire de la crête neurale, qui se développe dans le tissu sympathique et se trouve dans deux tiers des cas au niveau abdominal dans la glande surrénalienne, mais peut aussi prendre son origine dans les ganglions sympathiques.

Elle se manifeste surtout en bas âge et présente un comportement unique de par son hétérogénéité clinique et biologique [150]. On peut observer des régressions spontanées, des transformations en ganglioneurome, la variante bénigne du neuroblastome, ou en maladies métastatiques hautement agressives [151]. Cette diversité est étroitement liée aux nombreux facteurs cliniques et biologiques, comprenant le stade de la maladie, l'âge du patient, l'histologie et des anomalies génétiques [152-154].

Le neuroblastome est une tumeur à petites cellules rondes, composé de cellules indifférenciées de taille homogène, au noyau dense hyperchromatique et au cytoplasme basophile. Des prolongements neuritiques indiquent souvent l'amorce de différenciation de ces neuroblastes. Une caractéristique morphologique est l'agencement en pseudo-rosettes des cellules neuroblastiques (cellules de type-N en culture). Les neuroblastes ont la capacité de maturation et / ou de régression spontanée ou induite par le traitement, mimant l'évolution physiologique de la cellule embryonnaire sympathique vers la cellule ganglionnaire mature au sein d'un tissu schwannien. Ces cellules différenciées sont des cellules adhérentes en culture, dites cellules stromales ou cellules de type-S.

La classification anatomo-pathologique actuellement utilisée est la classification INPC (International Neuroblastoma Pathologic Classification) largement inspirée des anciennes classifications de Shimada et de Joshi [155]. Les 4 grandes catégories de tumeurs neuroblastiques de la classification INPC sont les suivantes :

- neuroblastome (stroma pauvre),
- ganglioneuroblastome mélangé (stroma riche),
- ganglioneuroblastome nodulaire (tumeur composite avec stroma riche et stroma pauvre),
- ganglioneurome (stroma dominant).

Dans le terme ganglioneuroblastome, le préfixe ganglio fait référence au contingent ganglioneuromateux et le suffixe neuroblastome à un composant neuroblastique clairement identifié. Chacune des 4 catégories présente un ou plusieurs sous-types. Les symptômes cliniques sont extrêmement variables, selon la localisation, la taille et l'extension de la tumeur primitive d'une part, et l'existence et la localisation de métastases d'autre part. Cependant, la base moléculaire expliquant la variété de la croissance tumorale, du comportement clinique et de la sensibilité au traitement, reste en grande partie inconnue.

2.1. Epidémiologie.

Le neuroblastome est le 2^{ème} cancer le plus fréquent chez l'enfant après les tumeurs cérébrales et représente + / - 9 % de l'ensemble des tumeurs pédiatriques [156]. C'est la tumeur maligne la plus fréquente chez les enfants de moins de 1 an : 36 % des patients ont moins de 1 an au diagnostic et 50 % moins de 2 ans. Elle survient exceptionnellement chez les adolescents et les adultes. Il n'y a pas de facteurs environnementaux connus pouvant être incriminés dans la genèse des neuroblastomes.

2.2. Présentation clinique.

Le neuroblastome se présente chez l'enfant en bas âge, rarement à l'âge scolaire. Les symptômes dépendent de la localisation et du stade de la maladie. La tumeur localisée est en général asymptomatique et découverte fortuitement, alors que les enfants avec une maladie métastatique sont en mauvais état général et présentent souvent des douleurs osseuses en raison d'une infiltration médullaire [157].

La présentation clinique sera variable en fonction de la localisation de la tumeur. Les symptômes dépendront aussi de l'âge du patient et de la présence ou non de métastases au diagnostic ; 60 % des neuroblastomes sont d'emblée métastatiques au diagnostic et se manifesteront par leurs métastases.

Les très jeunes enfants (< 1 an) se présenteront généralement avec une maladie localisée ou accompagnée d'une maladie disséminée particulière pouvant involuer spontanément et ayant un pronostic favorable. A l'opposée, la majorité des enfants de plus de 1 an se présenteront avec une maladie d'emblée avancée et de pronostic sombre [152].

Indépendamment de l'âge, la plupart des neuroblastomes ont leur origine dans l'abdomen (glande surrénale ou le long de la colonne vertébrale). Viennent ensuite les localisations intra-thoraciques, pelviennes et cervicales. Les patients avec une tumeur abdominale peuvent se présenter avec l'apparition d'une masse (Fig. 20), des douleurs, de la constipation...



Figure 20 : photo d'un enfant présentant une masse abdominale, localisation privilégiée des tumeurs neuroblastiques.

Une localisation métastatique typique est l'orbite, sous forme d'un hématome orbitaire, ecchymose palpébrale qui peut initialement être prise pour un traumatisme ce qui peut faire suspecter un enfant battu [156].

Les métastases dans les os et la moelle osseuse donneront douleur, boiterie, irritabilité. L'infiltration médullaire peut induire anémie, leucopénie et thrombopénie provoquant pâleur, fatigue, infection, saignements et ecchymoses. Une tumeur en sablier (Fig. 21), c'est-à-dire engainant la moelle épinière, peut provoquer des signes de compression médullaire avec apparition de parésie ou paralysie.

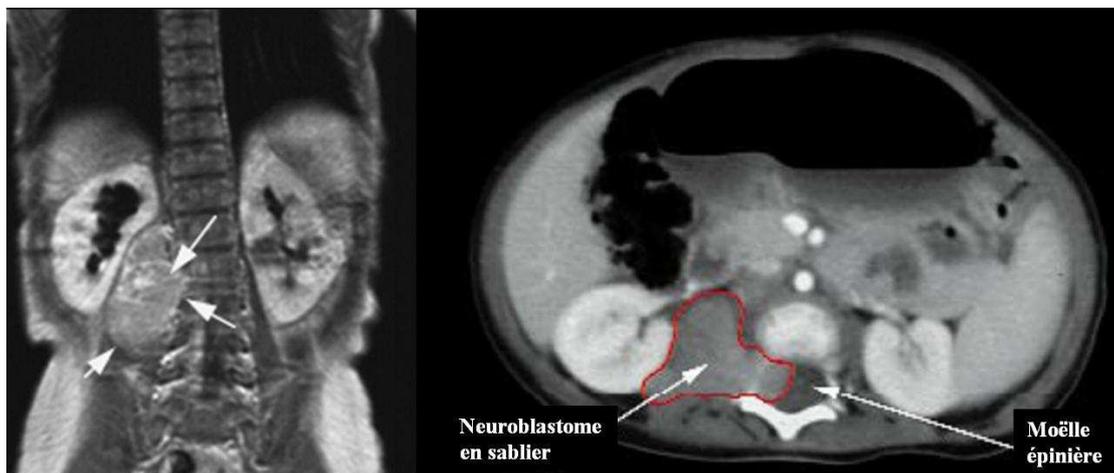


Figure 21 : neuroblastome en sablier.

Le nouveau-né ou le nourrisson présente souvent une forme particulière de neuroblastome caractérisée par une importante hépatomégalie, pouvant parfois provoquer une insuffisance respiratoire ou une compression de la veine cave, par des nodules cutanés et une infiltration de la moelle osseuse, alors que la tumeur primaire, souvent surrénalienne, est de petite taille. Ces formes particulières appelées 4S ont, malgré leur apparence clinique impressionnante, un très bon pronostic et ne nécessitent la plupart du temps pas de traitement [158].

2.3. Diagnostic

Le diagnostic est posé soit par analyse histologique d'une biopsie, soit par la présence de cellules tumorales typiques dans la moelle osseuse (aspiration ou biopsie) associée à une élévation des catécholamines urinaires.

La tumeur sécrète des catécholamines et ses dérivés, l'acide vanilmandélique (VMA) et l'acide homovanillique (HVA), qui sont pathognomoniques pour le neuroblastome.

Le bilan d'extension permet de définir le stade de la maladie et comprend une ponction-biopsie de moelle osseuse sur deux sites, une thoraco-abdominale, éventuellement cérébrale, une scintigraphie au méthyl-Iodo-Benzyl-Guanidine (mIBG) qui est spécifique pour le neuroblastome sécrétant des catécholamines, et une scintigraphie osseuse (Fig. 22). La mIBG est concentrée par les granules chromaffines comme la noradrénaline, et se concentre ainsi électivement dans les tissus adrénergiques [159, 160]. Les seules *fixations physiologiques* sont salivaires, myocardiques, hépatiques, spléniques, urinaires, et pulmonaires (apex), et à un faible degré surrénaliennes, ce qui rend parfois difficile l'interprétation chez l'enfant [161, 162]. La spécificité de cette technique approche 100 % [163]. Toute fixation osseuse est anormale, y compris sur les zones de croissance. Pour la détection de la tumeur primitive, la sensibilité est de 73 %, mais elle baisse à 45 % lorsque la tumeur primitive n'est pas sécrétante [163]. Comparativement à la méthode cyto-histologique, la sensibilité de la scintigraphie mIBG pour la détection des métastases médullaires est de 90 %. La sensibilité de la scintigraphie mIBG pour le diagnostic des localisations hépatiques est faible, estimée à 50 %, en raison de la fixation physiologique [163]. L'évaluation de la réponse à la chimiothérapie d'induction dans les NB stade 4 en MIBG aurait valeur pronostique [164].

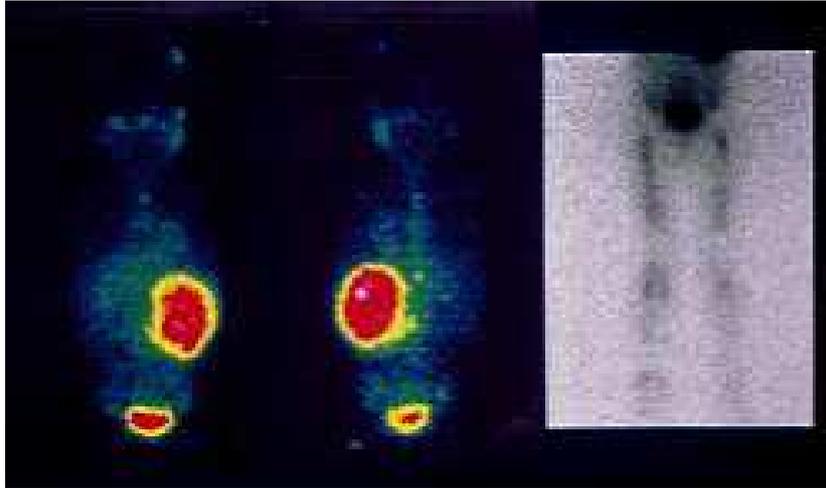


Figure 22 : scintigraphie au mIBG.

Une IRM spinale est indiquée si un neuroblastome en sablier est suspecté.

Le stade est ensuite défini selon la classification internationale du neuroblastome, "The International Neuroblastoma Staging System" (INSS) développée en 1986 et révisée en 1999 [165-167].

- **Stade 1** : tumeur localisée, exérèse complète (avec ou sans reliquat microscopique), ganglions homolatéraux et controlatéraux négatifs (alors que les ganglions attachés à la tumeur et enlevés peuvent être envahis).

- **Stade 2A** : tumeur localisée, exérèse macroscopiquement incomplète (selon le chirurgien ou l'imagerie post-opératoire), ganglions homolatéraux non adhérents négatifs en histologie.

- **Stade 2B** : tumeur localisée, exérèse complète ou non, ganglions homolatéraux non adhérents positifs, ganglions controlatéraux négatifs.

- **Stade 3** : tumeur unilatérale inopérable croisant la ligne médiane, avec ou sans atteinte ganglionnaire régionale ; *ou* tumeur unilatérale localisée avec envahissement des ganglions controlatéraux ; *ou* tumeur médiane avec extension bilatérale par infiltration (inopérable), *ou* par atteinte ganglionnaire.

- **Stade 4** : toute tumeur avec dissémination à distance : ganglionnaire, osseuse, médullaire, hépatique, cutanée, ou autre (sauf stade 4S).

- **Stade 4S** : âge < 1 an, tumeur localisée (stade 1, 2A, ou 2B), avec dissémination limitée à la peau, au foie, et / ou à la moelle osseuse (mais avec infiltration < 10%, et scintigraphie mIBG négative au niveau du squelette), sans métastase osseuse radiologique.

2.4. Pronostic

Certaines données cliniques et biologiques / génétiques liées au neuroblastome ont un impact sur l'évolution de la maladie et représentent des facteurs pronostiques. Leur identification est une excellente illustration de la recherche translationnelle, c'est-à-dire de l'application en clinique des résultats de la recherche fondamentale. Ces facteurs de pronostic sont aujourd'hui indispensables pour définir des catégories de risque de la maladie et cibler le traitement.

Le tableau 2 résume les connaissances actuelles concernant les facteurs pronostiques.

Enfants âgés de plus d'un an
<i>Facteurs de risques majeurs</i>
Stades 3 et 4
Amplification <i>MYCN</i>
Ploïdie (2N, 4N)
<i>Autres facteurs et marqueurs biologiques de risques</i>
Dopamine urinaire
HVA/VMA > 2
Trk-A
gène MDR1
CD44
site métastatique

Tableau 2 : facteurs pronostiques du neuroblastome.

En résumé, l'âge au moment du diagnostic, supérieur ou inférieur à une année de vie, et le stade de la maladie, restent les facteurs de pronostic principaux [168, 169]. Un neuroblastome métastatique chez le nourrisson a de très bonnes chances de guérir, alors que la même maladie chez un enfant plus âgé présente un comportement souvent très agressif, beaucoup plus difficile à traiter.

En 1984 puis en 1999, Shimada et al. [153] ont séparé l'histologie du neuroblastome en deux groupes, favorable et défavorable, selon le degré de différenciation neuroblastique, le contenu en stroma, l'index mitotique et l'âge au diagnostic. La révision de la classification pathologique (INPC) réalisée en 1999 [153], a confirmé la signification pronostique de ce partage [153].

Le comportement agressif des tumeurs avec une histologie défavorable est fortement corrélé avec l'amplification de l'oncogène *MYCN*, premier oncogène relevant dans le neuroblastome [170].

Environ 20 % des neuroblastomes présentent une amplification de l'oncogène *MYCN*, c'est-à-dire la présence de multiples copies de ce gène dans les cellules de la tumeur. Appartenant à la famille des oncogènes *MYC*, il est localisé sur la partie distale du bras court du chromosome 2, et est considéré comme spécifique du neuroblastome. Sa mise en évidence fait appel aux techniques classiques de biologie moléculaire. On peut ainsi mesurer le nombre de copies de l'oncogène *MYCN*, et l'on parle d'amplification à partir d'une copie, en sachant que la plupart des neuroblastomes amplifiés ont plus de 10 copies. Cet oncogène constitue actuellement l'un des facteurs pronostic les plus forts, plus le nombre de copies est élevé, plus le pronostic est péjoratif. Cette anomalie, considérée aujourd'hui comme le marqueur biologique de référence, est généralement associée à une tumeur métastatique, à un âge de 2 ans lors du diagnostic, et est corrélée avec un pronostic très défavorable en terme de survie [150]. Le contenu en ADN des cellules malignes joue un rôle pronostique surtout chez les enfants, 1 année de vie !

Une hyperdiploïdie, le plus souvent une triploïdie, (présence de trois copies de chaque chromosome) est fréquente dans le neuroblastome localisé, chez l'enfant jeune et équivaut à une excellente survie à long terme [171].

Les tumeurs diploïdes sont au contraire clairement plus agressives. Les anomalies génétiques telles que pertes et gains de certaines régions chromosomiques sont des manifestations fréquentes dans les tumeurs malignes. La perte d'une partie du bras court du chromosome 1, (délétion 1p), est souvent associée à des caractéristiques de haut risque du neuroblastome, telles qu'un âge avancé, une dissémination métastatique, une amplification de *MYCN*, et une issue défavorable.

Le gain, ou surreprésentation, du bras long du chromosome 17 (gain 17q) a été identifié comme l'altération génétique la plus fréquente du neuroblastome. Les gains du chromosome 17q, retrouvés dans 50 à 70 % des tumeurs semblent être associés à un mauvais pronostic [172, 173]. D'autres anomalies génétiques telles que des pertes au niveau 3p et 11q ont été récemment identifiées comme des facteurs pronostiques défavorables.

Certains récepteurs aux neurotrophines sont des protéines à activité tyrosines kinases (TrK), dont l'expression est perturbée dans le neuroblastome. Ils jouent un rôle essentiel dans le développement normal du système nerveux [174]. Le proto-oncogène *TrK* code un complexe hétéromérique formant le récepteur de haute affinité pour le facteur de croissance nerveuse, le NGFR. Le défaut de l'expression ou de la fonction de ce facteur a été mis en évidence sur les

lignées de neuroblastome, expliquant leur non-différenciation [170]. L'expression du *TrK*, ainsi que celle du NGFR, a été corrélée aux stades favorables de neuroblastomes. L'expression de *TrkA*, le récepteur à haute affinité du facteur de croissance nerveuse (NGF) est inversement corrélé avec l'amplification de *MYCN*. Son expression est donc associée à un bon pronostic [175]. Au contraire, la présence de *TrkB*, récepteur à une autre neurotrophine, le "Brain Derived Neurotrophic Factor" (BDNF), représente un facteur défavorable. Quel est l'impact de l'identification de multiples facteurs de pronostic ? La mise en commun des facteurs isolés, étudiés de façon rétrospective et prospective dans différentes études cliniques américaines et européennes a permis de définir des groupes à risque et d'orienter la nature et l'intensité du traitement selon ces paramètres [173, 176].

Un autre oncogène, le "Multiple Drug Resistance" ou *MDR*, oncogène de la résistance multiple aux drogues, est un système permettant d'activer une pompe membranaire au niveau de la cellule tumorale neuroblastique, et de rejeter ainsi certains antimitotiques. L'utilisation d'agents réservants cette pompe (quinidine, ciclosporine) pourrait alors permettre une meilleure efficacité thérapeutique.

2.5. Traitement

La prise en charge thérapeutique du neuroblastome comprend essentiellement la chimiothérapie et la chirurgie.

La chimiothérapie conventionnelle (à doses normales) a pour but d'une part de réduire la masse tumorale pour la rendre opérable, et d'autre part de traiter les métastases. La chimiothérapie à haute dose suivie d'une reperfusion de cellules souches de la moëlle épinière sert à consolider une rémission complète ou presque complète et a trouvé sa place définitive dans le traitement du neuroblastome métastatique depuis le travail de Matthey et al. [177].

La chirurgie doit être considérée en deux temps : contribution diagnostique et étape thérapeutique, dont la place est clairement déterminée par les protocoles de prise en charge. Il faut ainsi distinguer les tumeurs de stade 1 ou 2 (dont la résection peut être envisagée primairement et les stades plus avancés). Dans ces derniers cas, il est alors nécessaire après confirmation du diagnostic, d'envisager l'exérèse tumorale seulement après réduction du volume tumoral par une chimiothérapie. En cas de tumeur localisée, bien circonscrite, une opération en première intention doit être considérée si la résection peut être faite sans risque vital, fonctionnel (par exemple, laminectomie) ou sacrifice d'organe (par exemple, néphrectomie). Cette résection doit être a priori complète. Cependant, s'il existe un envahissement des gros vaisseaux, une tumeur localisée peut être considérée comme inopérable et nécessiter une chimiothérapie préopératoire. En cas de tumeur volumineuse ou métastatique, la chirurgie n'est envisagée qu'après une chimiothérapie visant la

réduction du volume tumoral, la délimitation de la tumeur par rapport aux gros vaisseaux et la disparition des métastases. A ce stade, une résection la plus complète possible doit être entreprise en prenant soin d'éviter le sacrifice d'organe adjacent. Une place particulière est réservée à la chirurgie des résidus tumoraux, directement liés au caractère invasif péri vasculaire du neuroblastome. Ces restes de tumeurs encore présents après les traitements de chimiothérapie pré- et post-opératoires nécessitent une évaluation fonctionnelle par scintigraphie au mIBG avant d'être réséqués.

La radiothérapie. La radiothérapie contribue au contrôle local de la maladie dans les tumeurs amplifiant *MYCN*, dans les résidus tumoraux encore actifs ou dans les récidives. Au vu de la nocivité des rayons chez les enfants en bas âge, elle est rarement considérée en première intention [178]. Plusieurs groupes susceptibles de recevoir une radiothérapie ont été définis :

Groupe à faible risque Ces patients guérissent souvent avec un traitement minimal. La résection chirurgicale première reste souvent le seul traitement pour les neuroblastomes de stades 1, 2A et 2B et permet à 85-98 % d'enfants de guérir de leur maladie. Le stade 4S chez le nouveau-né ou le nourrisson est également considéré comme maladie à faible risque [177].

Groupe à risque intermédiaire. Il s'agit du groupe de patients avec des tumeurs souvent inopérables au premier abord. Plusieurs études ont montré que la survie à long terme varie entre 75 et 95 %.

Groupe à haut risque. Il s'agit du groupe de malades où les progrès ont été les plus modestes jusqu'à présent. L'intensification du traitement par chimiothérapie à haute dose a permis de porter le taux de guérison à environ 40 % [177]. Malheureusement, malgré ces traitements très intenses, plus de 50 % d'enfants vont rechuter à cause d'une maladie résiduelle de résistance. L'éradication de la maladie résiduelle est un des grands efforts des dernières années. De premiers résultats favorables ont pu être obtenus avec le 13-cis-acide rétinoïque, un agent de différenciation des neuroblastes, avec une amélioration significative de la survie dans une étude randomisée [177].

Groupes particuliers. Compression spinale. Les traitements efficaces sont la chimiothérapie, la décompression par laminectomie et la radiothérapie mais un meilleur traitement doit encore être établi.

2.6. Conclusions / Perspectives

Le neuroblastome est une maladie tumorale unique chez l'enfant de par l'hétérogénéité clinique et biologique qu'elle présente. Les connaissances acquises permettent de soigner aujourd'hui de façon efficace la plupart des tumeurs localisées et les formes biologiquement favorables des tumeurs métastatiques. De nombreuses recherches sont encore nécessaires pour améliorer le pronostic de la forme la plus agressive.

Les nouvelles stratégies thérapeutiques visent à améliorer les traitements contre les neuroblastomes métastatiques, mais aussi celui exprimant plusieurs copies de *MYCN*, puisque le pronostic reste sombre.

Les tendances de la recherche concernent de nouveaux agents chimiothérapeutiques, de nouvelles formes de rétinoïdes pour le traitement de la maladie résiduelle, de l'immunothérapie pour une approche plus sélective sans réaction croisée avec la chimiothérapie, de la mIBG marquée et des agents anti-angiogéniques. Elles visent aussi à améliorer la qualité de la survie à long terme qui, pour les stades avancés de la maladie, est liée à trop de séquelles cardiaques, pulmonaires et hormonales, pour n'en citer que quelques-unes.

3. Thérapies de différenciation

3.1. Généralités.

Le processus de cancérisation est un phénomène complexe qui implique généralement une accumulation progressive d'erreurs génétiques influencées par des facteurs environnementaux. Toutefois, même si les étapes conduisant à la transformation d'un tissu sain en tissu cancéreux diffèrent selon les types cellulaires, elles ont pour conséquence une altération des processus de différenciation et de maturation des cellules [149].

Les traitements habituellement utilisés pour lutter contre les cellules cancéreuses, radiothérapie et chimiothérapie, sont souvent efficaces mais aussi peu spécifiques et touchent également les cellules saines de l'organisme d'où leurs effets secondaires conséquents. Ces traitements sont également hautement toxiques car la plupart des drogues anti-cancéreuses sont des agents s'intercalant dans l'ADN et peuvent conduire à l'apparition de résistances aux molécules [179].

Depuis quelques années, une nouvelle approche thérapeutique a vu le jour autour du concept de thérapie de différenciation [149, 180]. Cette thérapie fait appel à des agents qui, seuls ou associés à des molécules anti-cancéreuses classiques, sont capables de freiner la prolifération cellulaire et de réinitialiser les mécanismes de différenciation cellulaire qui ont été modifiés au cours de la transformation maligne [149, 180]. Les cellules qui se différencient reprennent un cycle cellulaire normal et meurent par apoptose.

Tous les types de cancers revêtent un caractère plus ou moins différencié et pourraient être concernés par une thérapie de différenciation. Cependant, à ce jour, un nombre restreint de cancers susceptibles de répondre aux agents différenciants a été étudié. Les cancers les plus concernés sont les leucémies [181] et notamment par son caractère hautement indifférencié les leucémies aiguës, et

concernent également les neuroblastomes [182, 183], les cancers de la thyroïde, le mélanome [149] ou encore les cancers hormono-dépendants tels que les cancers du sein ou de la prostate.

En ce qui concerne notre revue bibliographique nous nous intéresserons plus particulièrement aux neuroblastomes.

3.2. Neuroblastomes.

Les tumeurs neuroblastiques résultent, en grande partie, d'une altération de migration, voire d'un déficit de différenciation des cellules sympathiques dérivant de la crête neurale. Deux familles de facteurs trophiques, les neurotrophines et les rétinoïdes, sont très étudiées en tant que molécules de signalisation et agents morphogènes essentiels à la différenciation et à la survie des cellules neuronales. Cette thérapie concerne essentiellement la maladie résiduelle de résistance.

3.2.1. *Les neurotrophines.*

Les neurotrophines, "nerve growth factor" (NGF), BDNF, neurotrophine-3 et -4 (NT3 / NT4), jouent un rôle central dans le développement du système neuronal normal. Leur action est médiée par les récepteurs à activité tyrosine kinase de la famille TrK, comme les récepteurs de haute affinité TrK A, B et C, ainsi qu'un récepteur de plus faible affinité p75^{NTR} [184].

La découverte du NGF et de son récepteur TrK A a permis de mieux comprendre le mécanisme moléculaire de différenciation et de mort cellulaire programmée du neuroblastome. Une corrélation étroite entre le niveau d'expression de ces récepteurs et la tumorigénicité des neuroblastomes a été décrite et associe une forte expression du récepteur Trk A aux tumeurs à pronostic favorable et à une diminution du nombre de copies de *MYCN* [175]. La transfection du gène du récepteur Trk A dans une lignée de neuroblastome déficiente en Trk A, lui restaure sa capacité de différenciation [185]. Au contraire, l'expression du récepteur Trk B est associée aux tumeurs fortement amplifiées en *MYCN* et à mauvais pronostic. Un grand nombre de ces tumeurs expriment aussi BDNF, favorisant ainsi croissance et survie des cellules tumorales par voie autocrine [186]. Ainsi, le profil d'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs Trk est déterminant dans l'appréciation du degré de différenciation des neuroblastomes.

3.2.2. *Les rétinoïdes.*

En raison de leurs effets inducteurs puissants à la fois sur les processus de différenciation et d'apoptose, les rétinoïdes sont des agents très utilisés dans le traitement des cancers. L'acide rétinoïque est l'un des plus puissants inducteurs de différenciation des neuroblastomes *in vitro* [182]. Une diminution de l'expression de l'oncogène *MYCN* a été associée à un arrêt de la prolifération cellulaire dans des lignées cellulaires de neuroblastomes traitées par acide rétinoïque

[187]. A l'inverse, une augmentation de l'expression du récepteur RAR- β s'est avérée être un facteur de bon pronostic pour les tumeurs neuroblastiques [188]. Quant aux rétinoïdes liant spécifiquement les récepteurs RAR- γ , ils sont plutôt associés au processus apoptotique [189]. Une étude clinique, conduite par Matthay et al. [177], indique qu'à l'issue d'une chimiothérapie à haute dose et d'une autogreffe de moelle osseuse, un traitement à l'acide 13-cis-rétinoïque apporte un bénéfice aux patients chez lesquels il n'y a pas de progression de la maladie.

Ces nouvelles données ont modifié le protocole thérapeutique français des neuroblastomes métastatiques : la chimiothérapie classique (cyclophosphamide, étoposide ou VP16, cisplatine ou carboplatine) est désormais prolongée par un traitement d'entretien de 6 mois par l'acide rétinoïque. Les rétinoïdes synthétiques, comme le fenrétinide, spécifiquement inducteurs d'apoptose, sont développés en recherche [190] et actuellement proposés en clinique. Ces nouveaux rétinoïdes présentent l'avantage d'une part d'induire une apoptose plus importante et, d'autre part, d'être moins toxiques que les chimiothérapies actuelles.

3.2.3. *Les thiazolidinediones.*

Les thiazolidinediones, dont fait partie la rosiglitazone, sont les ligands de trois isotypes de récepteurs activés par les proliférateurs des peroxisomes ou « Peroxisome Proliferator Activated Receptor » (PPAR) : α , δ (β) et γ . Une fois activés par leurs ligands, les PPAR forment des hétérodimères avec le récepteur nucléaire RXR (9-cis Retinoic Acid Receptor) et modulent la transcription après s'être fixés sur des séquences spécifiques PPRE (Peroxisome Proliferator Response Elements) localisées dans les régions régulatrices de leurs gènes cibles.

Les données récentes de la littérature [191], suggèrent que l'utilisation d'agonistes du récepteur nucléaire PPAR- γ pourrait représenter une nouvelle approche thérapeutique prometteuse pour la chimio-prévention ou / et le traitement de certains cancers chez l'homme. PPAR- γ est un facteur de transcription activé par la liaison d'un ligand. Plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo* tendent à montrer des effets antinéoplasiques de PPAR- γ au sein des tumeurs coliques humaines [191]. Mais les gènes cibles du récepteur sont encore mal connus dans ces tumeurs.

La Rosiglitazone (RGZ), ligand des PPAR- γ a des effets antagonistes sur les lignées neuroblastiques. A 20 μ M, elle diminue la prolifération et la viabilité cellulaire dans la lignée SK-N-AS mais pas dans SH-SY5Y [192]. La rosiglitazone a montré des effets anti-apoptotiques par induction de l'expression de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase par régulation de la balance bax / bcl-2, donc faisant appel à des propriétés anti-oxydatives [193, 194].

Si certaines tumeurs cancéreuses peuvent être traitées, le diagnostic de cancer équivaut encore dans de nombreux cas à un arrêt de mort en dépit de tous les efforts de la médecine. Même si une intervention chirurgicale permet d'enlever toute trace de la tumeur, de nouvelles cellules cancéreuses peuvent rapidement se développer et prendre la place de la tumeur originale. Certains cancers résistent même aux substances chimiques toxiques et aux radiothérapies intenses, armes puissantes qui tuent rapidement les cellules en mitose et stoppent la croissance des autres tumeurs.

La clé de l'énigme - pourquoi certaines tumeurs sont-elles si difficiles à traiter ? - se trouve peut-être dans les cellules souches cancéreuses.

Nous avons vu que dans les neuroblastomes, les bases moléculaires expliquant l'activation de la croissance tumorale, du comportement et de la sensibilité au traitement restent en grande partie inconnue. Nous savons que le pronostic de ces cancers neuroblastiques est encore sombre de nos jours et que les raisons de cet échappement thérapeutique restent à élucider. La présence de cellules souches cancéreuses pourrait en être la cause.

D. Notions de cellules souches cancéreuses.

1. Généralités.

Une cellule souche a la capacité unique de :

- s'auto-renouveler indéfiniment ou de manière prolongée, dans ce cas la division cellulaire est symétrique (Fig. 23) ;

- produire différentes cellules spécialisées (différenciées). La division est dans ce cas asymétrique ; les cellules filles ne sont pas identiques, et seule une des deux est identique à la cellule mère (Fig. 23).

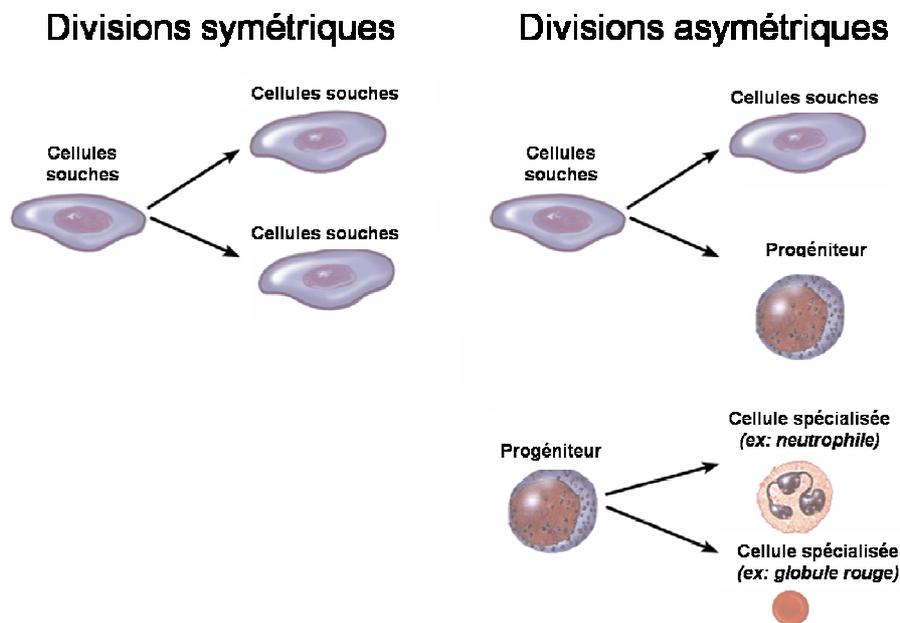


Figure 23 : notion d'auto-renouvellement et de division symétrique et asymétrique d'une cellule souche

2. " Des cellules souches qui ne nous veulent pas du bien ! »

Durant des décennies, les chercheurs en oncologie ont été confrontés à deux visions concurrentes des tumeurs : dans un scénario, toutes les cellules d'une tumeur sont identiques et ont une même capacité à se diviser et à former de nouvelles tumeurs. Dans l'autre scénario, seules quelques cellules spécifiques sont capables de former de nouvelles tumeurs : les cellules souches cancéreuses.

La notion de cellules souches cancéreuses date des années 1950 au moins [195], mais pendant longtemps les scientifiques n'ont pas été en mesure de mener à bien les expériences nécessaires pour prouver leur existence en séparant les cellules souches cancéreuses des autres cellules de la tumeur.

La plupart des chercheurs étaient d'avis que ces résultats ne s'appliquaient qu'à la leucémie et non aux tumeurs solides. En 2003, toutefois, une autre équipe de chercheurs de l'Université de Michigan Medical School à Ann Arbor, dirigée par le docteur Muhammad Al-Hajj [196], a découvert qu'une petite minorité de cellules humaines de cancer du sein, représentant de 1 à 2 % de la tumeur, pouvaient reformer des tumeurs une fois implantées dans des souris [197].

Une équipe de scientifiques du centre italien de recherche en oncologie, situé à Milan, a fait une découverte majeure dans la recherche sur le cancer du sein en isolant des cellules souches de tissus cancéreux prélevés chez une personne adulte atteinte du cancer du sein et en les propageant *in vitro* [198]. L'expérience a permis l'identification de "mauvaises" cellules souches responsables de la croissance des tumeurs. Ces cellules diffèrent des types de cellules souches transplantées pour traiter le lymphome et la leucémie. Cette équipe a franchi une nouvelle étape en isolant des cellules cancéreuses du sein ayant les propriétés de cellules souches et en les propageant pour la première fois *in vitro* [199]. L'équipe a décrit l'isolement et la propagation *in vitro* de cellules initiatrices de cancer du sein prélevées sur trois lésions de cancer du sein et une lignée cellulaire établie de cancer du sein [27]. Les cultures dérivées de carcinomes mammaires comprenaient des cellules indifférenciées capables d'auto-reconstitution, de prolifération extensive sous forme de grappes clonales sphériques non adhérentes, et de différenciation entre lignées épithéliales mammaires différentes. Ces cellules cultivées, identifiées par l'expression membranaires de CD44 et CD24, exprimaient également un marqueur spécifique de cellule souche Oct-4[200]. Elles sont capables de produire de nouvelles tumeurs dès que 10^3 d'entre elles sont transplantées, contre 10^6 cellules nécessaires en absence de sélection préalable.

Les premières expériences réussies ont été effectuées sur des cellules sanguines. En 1997, une équipe de chercheurs de l'université de Toronto [28] a implanté dans des souris des cellules cancéreuses prélevées chez des patients atteints de leucémie, et a ainsi pu démontrer qu'une cellule leucémique humaine sur un million, en gros, était capable de reproduire la maladie. Les chercheurs en ont conclu que ces cellules rares pouvaient être considérées comme des cellules souches cancéreuses.

Des protéines, appelées marqueurs tumoraux, sont présentes à la surface de la plupart des cellules cancéreuses. Ces marqueurs sont similaires aux empreintes digitales. Des scientifiques ont observé que les cellules dangereuses, capables de reproduire la maladie, présentaient à leur surface

des protéines caractéristiques : les cellules souches de la leucémie arborent une protéine, appelée CD34, également présente sur les cellules souches hématopoïétiques saines mais pas sur d'autres. En outre, la protéine CD38 - observée sur la plupart des autres cellules leucémiques - est systématiquement absente des cellules souches leucémiques humaines [201].

Plus tard au cours de l'année 2003, deux équipes de chercheurs ont présenté, de façon indépendante, des preuves du rapport de causalité entre cellules souches cancéreuses et tumeurs cérébrales. Les docteurs Peter Dirks et Sheila Singh (Université de Toronto) ont depuis démontré que les tumeurs du cerveau chez l'humain comprennent des catégories tumorigènes et non tumorigènes de cellules [202]. La tumeur la plus répandue du cerveau, le glioblastome, est marquée par la présence de cellules souches cancéreuses, qui au lieu de remplacer des cellules endommagées forment un tissu cancéreux [203]. Dans leur travail, des scientifiques de l'Université John Hopkins et de l'Université de Milan se sont basés sur une classe de protéines, les protéines morphogènes d'os (« bone morphogenetic protein », BMP) qui font perdre leur capacité à se diviser aux cellules ayant des propriétés semblables à celles des cellules souches.

Dans un premier temps ils ont traité préalablement les cellules humaines de glioblastome avec la protéine BMP4, puis ont injecté ces cellules traitées dans les cerveaux des souris [203]. Alors que des cancers envahissants se sont développés chez les souris greffées par des cellules non traitées, aucune tumeur n'est apparue lorsque les cellules ont été préalablement incubées avec la BMP4. Toutes les souris ayant reçu les cellules non traitées sont mortes après quatre mois alors que presque toutes les souris ayant reçu les cellules traitées étaient vivantes.

Dans un second temps les scientifiques ont injecté le BMP4 dans les cerveaux de souris où des cellules de glioblastome avaient été implantées [203]. Les souris n'ayant pas reçu le BMP4 ont développé des tumeurs malignes létales. Les souris traitées ont survécu beaucoup plus longtemps. 80 % ont survécu près de quatre mois après l'implantation des cellules cancéreuses [203].

La recherche sur les cellules souches cancéreuses promet également de nouvelles découvertes sur le mode de propagation des cancers, la métastase. Selon les théories conventionnelles, la métastase est un processus évolutif au cours duquel un petit nombre de cellules d'une tumeur primaire accumulent progressivement des mutations génétiques qui leur permettent de s'étendre à d'autres tissus et d'y former de nouvelles tumeurs. Le modèle alternatif proposé aujourd'hui est le suivant : de nombreuses cellules d'une tumeur primaire se répandent dans le corps, mais une seconde tumeur ne peut se former que lorsqu'une cellule souche rare atteint un nouvel emplacement.

Les cultures à long terme de cellules tumorigéniques ayant des propriétés de cellules souches pourraient offrir un modèle *in vitro* approprié pour l'étude des cellules initiatrices de cancer, et constituer un outil valable pour développer des médicaments spécifiques et des stratégies thérapeutiques visant à éradiquer les cellules souches cancéreuses des tumeurs.

Cette théorie pourrait être extrapolée aux tumeurs du système nerveux périphérique, en particulier, les tumeurs neuroblastiques. Ainsi, la SdFFF peut s'inscrire dans l'isolement de ces cellules qui si elles sont identifiées pourraient servir de modèles d'étude pour tester les effets de drogues spécifiques induisant l'apoptose ou mieux la différenciation.

III. TRI CELLULAIRE PAR SdFFF : MÉTHODOLOGIES ET APPLICATIONS.

Dans ce dernier chapitre de la partie bibliographique, nous allons finalement discuter du rôle et de l'intérêt de la technique de SdFFF en matière de tri cellulaire. Au cours de cette dernière décennie, sur la base de l'expérience acquise en GFFF [204, 205], le laboratoire de Chimie Analytique a développé sous la direction de Monsieur Le Professeur P. Cardot, l'instrumentation et les méthodologies faisant de la SdFFF une technique mature de tri cellulaire [8]. Parmi les différentes méthodes de tri cellulaire : panning, chromatographie liquide en microcolonnes, chromatographie d'affinité, cytométrie en flux (FC et fluorescent activated cell sorting ou FACS), méthodes utilisant des aptamères, électrophorèse capillaire, diélectrophorèse, méthodes immuno-magnétiques (magnetic activated cell sorting ou MACS), FFF magnétique et électrique...; la SdFFF se définit comme une méthode analytique ou préparative, non invasive, respectant l'intégrité fonctionnelle des cellules isolées (viabilité, spécificité métabolique, état de maturation).

Le rôle des différentes méthodes de FFF dans le domaine des biotechnologies s'accroît régulièrement [4, 5, 7, 8]. Dans de nombreux domaines, la SdFFF fut l'une des méthodes pionnières, en particulier dans celui du tri cellulaire où elle conserve une place de choix [5, 17]. Ceci concerne la microbiologie au sens large, l'hématologie, la neurologie (développée par l'équipe du Prof. Cardot), la cancérologie ou le domaine des cellules souches [5, 11, 17, 34, 52, 205-220].

Ces principales qualités : non-invasivité (méthode sans marquage) et respect de l'intégrité fonctionnelle ; découlent directement de la mise en œuvre d'une instrumentation et d'une méthodologie d'élution, basée sur la stricte observance de l'application du mode « Hyperlayer », limitant au maximum les interactions cellules / phase-solide.

Dès lors, la séparation ne dépend plus que de la distribution des propriétés biophysiques dans la population étudiée, évitant toute préparation complexe longue ou coûteuse de l'échantillon telles que les marquages immuno-fluorescents ou immuno-magnétiques. Ceci représente l'avantage majeur des méthodes dites physiques (basées sur une différence de taille et / ou de densité) sur les méthodes immunologiques (FACS / MACS), en particulier lorsque les antigènes sont peu ou pas exprimés (cellules souches), lorsque les anticorps ne sont pas disponibles, lorsque le marquage risque d'influencer l'utilisation ultérieure des cellules (culture, transplantation), ou enfin lorsque celui-ci risque d'induire l'activation ou la modification de l'état de différenciation cellulaire (cellules souches).

La séparation est également réalisée dans le respect des notions de répétabilité, de reproductibilité (fidélité intermédiaire), tout en assurant un rendement élevé et la stérilité des fractions recueillies.

Un couplage de l'élution, basée sur les propriétés physiques de l'échantillon, avec les méthodes classiques d'analyse cellulaire : méthodes de biologie cellulaire, immunologiques ou de biologie moléculaire ; permet un calibrage des profils d'élution selon une nouvelle dimension relative au critère biologique d'intérêt telle que la ploïdie, la position dans le cycle cellulaire,... (concept de cellulomique, Fig. 25) ; laissant envisager des applications analytiques ou préparatives.

Parmi les applications les plus récentes développées au laboratoire de Chimie Analytique nous pouvons citer celles concernant l'oncologie et le domaine des cellules souches [31, 32, 52, 130, 212, 213, 216, 221, 222].

A. Sedimentation Field-Flow Fractionation : recent advance in instrumentation and cell separation application.

G. Bégaud-Grimaud¹, S. Battu¹, M.F. Dreyfuss¹, M.O. Jauberteau^{2*}, P. J. P. Cardot^{1*}.

To be submitted to Trends In Analytical Chemistry

¹ : Laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie, E.A. 3842, "Homéostasie Cellulaire et Pathologies", Université de Limoges, Faculté de Pharmacie, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges Cedex, France.

² : Laboratoire d'Immunologie, E.A. 3842, "Homéostasie Cellulaire et Pathologies", Université de Limoges, Faculté de Médecine, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges Cedex, France.

*Corresponding author :

Tel. : + 33-5-5543-5857868.

Fax : + 33-5-5543--5985716. E-mail : m-o.jauberteau-marchanphilippe.cardot@unilim.fr



MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. FRACTIONNEMENT PAR COUPLAGE FLUX FORCE DE SEDIMENTATION (SDFFF).

A. La SdFFF.

La méthode de fractionnement par couplage flux force de sédimentation fait intervenir un champ de gravité pour la séparation des espèces [2]. Le champ le plus simple à mettre en œuvre est celui qu'exerce la gravité terrestre (force = 1 g). Cette méthode, nommée FFF gravitationnelle ou GFFF (Tableau 1), se pratique avec l'appareillage de FFF le plus simple et le moins onéreux qui soit (Fig. M1-A). Mais il est très difficile de moduler la valeur du champ et les temps de rétention sont parfois très longs (faible débit de phase mobile), ce qui limite l'applicabilité de la méthode [2, 4, 9, 20, 225].

La méthode proprement dite de FFF de sédimentation fait intervenir des champs multigravitationnels (force $\gg 1$ g), par la mise en rotation du canal à l'intérieur d'un bol de centrifugation afin de produire des champs élevés, d'intensités variables et programmables, impliquant cette fois-ci un dispositif instrumental complexe (Fig. M1-B) [2, 4, 9, 20, 225].

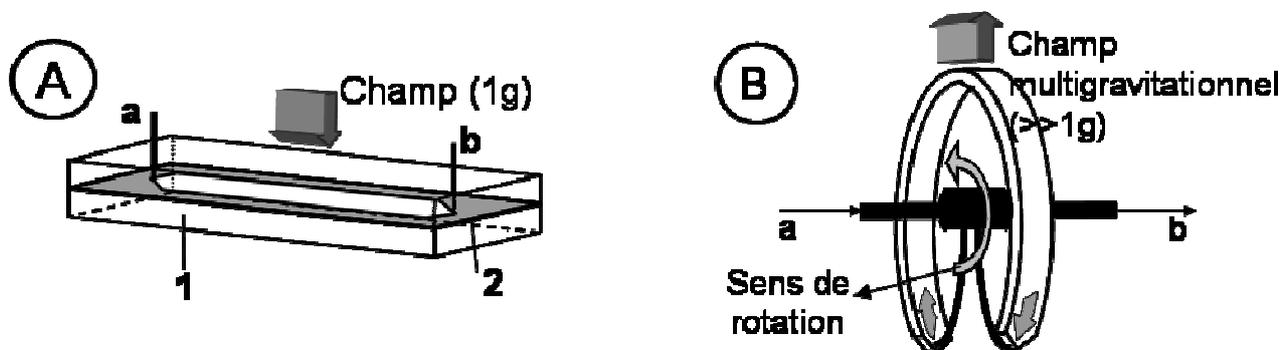


Figure M1 : schémas comparés des appareillages de GFFF (A) et de SdFFF (B). a et b: entré/sortie de la phase mobile ; 1: paroi d'accumulation; 2: feuille de Mylar®.

Cette complexité instrumentale et la nécessité de production de joints tournants fiables ont fortement limité la diffusion de cette technique, qui est cependant reconnue par la communauté scientifique comme l'une des plus efficaces et des plus polyvalentes : mise en œuvre de tous les modes d'éluion, échelle des particules : 50 nm - 50/100 μ m [2, 4, 5, 7]. C'est également une des seules méthodes permettant la séparation et la caractérisation des particules grâce à la connaissance précise des relations définissant l'ordre d'éluion en fonction de la taille ou de la densité [2, 4, 5, 7].

B. Instrumentation.

La figure M2 représente le schéma général d'un appareil de SdFFF développé au sein de notre laboratoire :

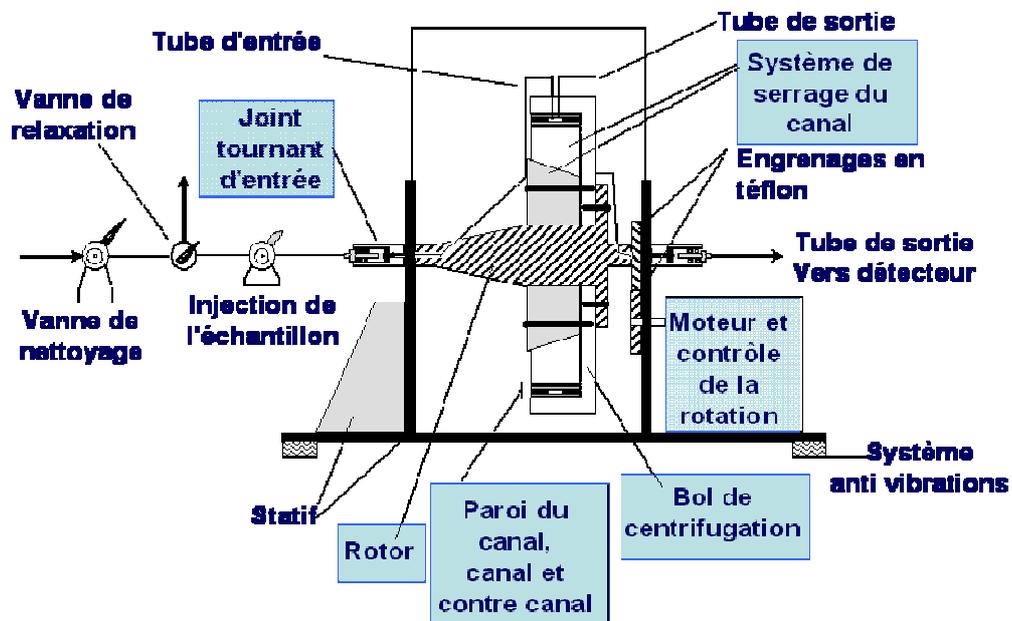


Figure M2 : schéma général d'un appareil de SdFFF (coupe transversale).

Contrairement à la GFFF, le canal n'est plus disposé à plat mais en arc de cercle dans le bol de centrifugation (Fig. M3).



Figure M3 : photographie d'un bol de centrifugation dans lequel est inséré le canal.

Sa mise en rotation nécessite la construction d'un appareillage complexe dont les trois parties principales sont :

- le système de rotation. Rôle: création et contrôle du champ multigravitationnel : moteur électrique, système de contrôle de la vitesse de rotation (manuel ou informatisé), système de transmission par courroies ou d'engrenages, arbre de rotation (rotor) qui supporte le bol et les joints tournants ;

- le bol de centrifugation. Rôle: maintien constant de la géométrie du canal, prévention des fuites du canal ;

- les joints tournants. Rôle: il permet le passage de la phase mobile au travers du canal. Ils assurent la transition d'un liquide d'un système immobile (pompe, système d'injection, détecteur, collecteur) à un système en rotation. Ils supportent le maximum de stress mécanique : vitesse de rotation élevée, débit et pression de phase mobile importants. De leur qualité dépend l'absence de fuite de phase mobile et d'échantillon.

C. Développement instrumental de phase-1.

La diffusion mondiale des techniques de FFF, et de la SdFFF en particulier, a été jusqu'à présent fortement limitée par le manque récurrent de matériels fiables disponibles à la commercialisation [2, 4, 5]. Ainsi, de nombreuses équipes, bien que désireuses d'utiliser la SdFFF, méthode complexe en terme de technologie, y ont renoncé par manque de matériels adéquats ou de savoir faire pour le développer. De ce fait, en produisant nos prototypes, nous avons acquis au cours de cette dernière décennie une expérience et une place unique aux niveaux européen et mondial. Durant ces dernières années, nous avons progressivement modifié l'ensemble des pièces maîtresses de l'appareillage : statif, bol de centrifugation, contrôle et pilotage du moteur, joints tournants, afin de les fiabiliser, et de permettre leur adaptation au tri cellulaire aseptique [8, 11, 304, 326, 344].

1. Les joints tournants.

Ils sont les pièces maîtresses du dispositif.

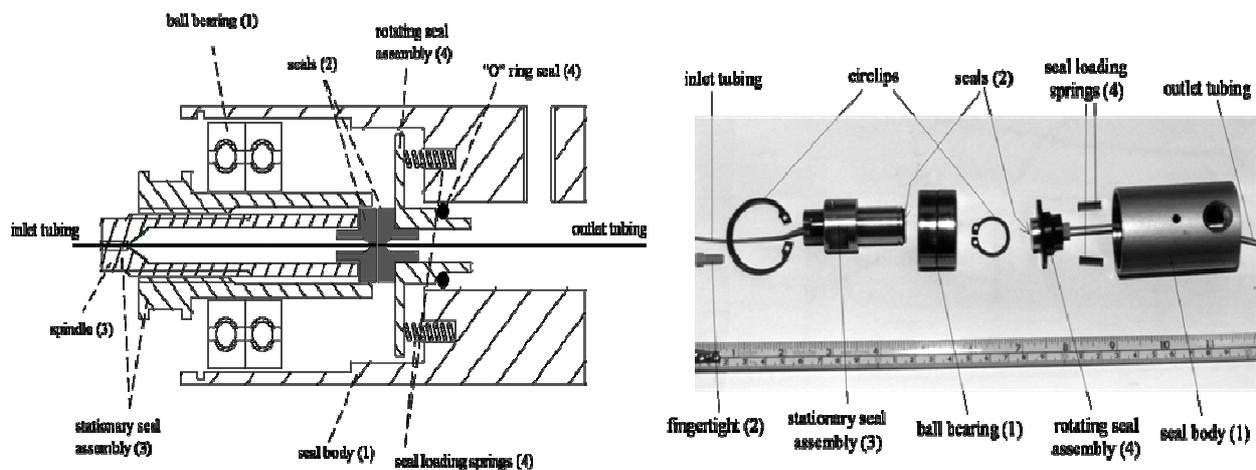


Figure M4 : schéma de la coupe transversale et vue éclatée d'un joint tournant. Inlet/outlet tubing: tube d'entrée et de sortie, Circlips : circlips; Seals: joints ; Seal loading spring: ressort de mise en pression des joints; Fingertight: dispositifs de serrage manuel des tubulures ; Stationary seal assembly : support d'alignement, de rotation et de mise en pression des joints dans la cage; Ball bearing: roulement à bille; Rotating seal assembly: support joint arrière; Seal body: cage.

Les tubulures d'entrée et de sortie sont en PEEK[®] (polyethercétone, Upchurch, CIL, Ste Foy-La-Grande, France), matériau biocompatible, de très faible diamètre interne (0,010 à 0,025 inches) afin de limiter les volumes morts et la diffusion longitudinale extra-canal (élargissement de bande). Le joint devra permettre le passage de la phase mobile et des échantillons entre un tube immobile et un tube mobile sans fuite [326]. Les joints sont fabriqués par Filton puis modifiés (Les Ateliers Modernes, Aix-sur-vienne, France) afin de répondre à nos exigences en terme de fiabilité et de libération de particules microniques lié à l'usure.

Ces joints répondent à différentes exigences :

- faible contribution au volume mort extra-canal (tubulures PEEK[®]),
- facilité de maintenance,
- fiabilité et résistance.

Ce dernier point est crucial. Il dépend de la précision de montage qui est lié à la qualité d'usinage et au dessin du joint. Le but est d'obtenir la plus parfaite planéité au niveau de la zone de contact entre les joints (parties en friction, Fig. M4). Le choix des matériaux constituant ces joints est alors primordial [344]. Ceci a donné lieu à une partie importante du travail de mise au point

initiale. La meilleure combinaison semble être l'utilisation d'une partie fixe abrasive (laiton) et d'une partie mobile tendre (carbone), permettant, après une période de rodage, l'imbrication des deux pièces assurant ainsi une parfaite étanchéité. Le protocole de rodage a lui même fait l'objet de mise au point et de validation : rotation à vitesse continue modérée (200 tr/min), d'abord sans flux de phase mobile, puis en augmentant progressivement le débit.

Ces joints présentent, en utilisation courante, une durée de vie variable de 6 à 18 mois selon le stress auquel ils sont soumis (vitesse de rotation, d'accélération et de décélération). Le changement des pièces d'usure, phase de maintenance obligatoire, s'effectue en 1 heure par une personne expérimentée.

2. Le bol de centrifugation.

Le canal est obtenu par découpe d'une feuille de Mylar® aux dimensions choisies: $L \times l \times e$ (Fig. M5).

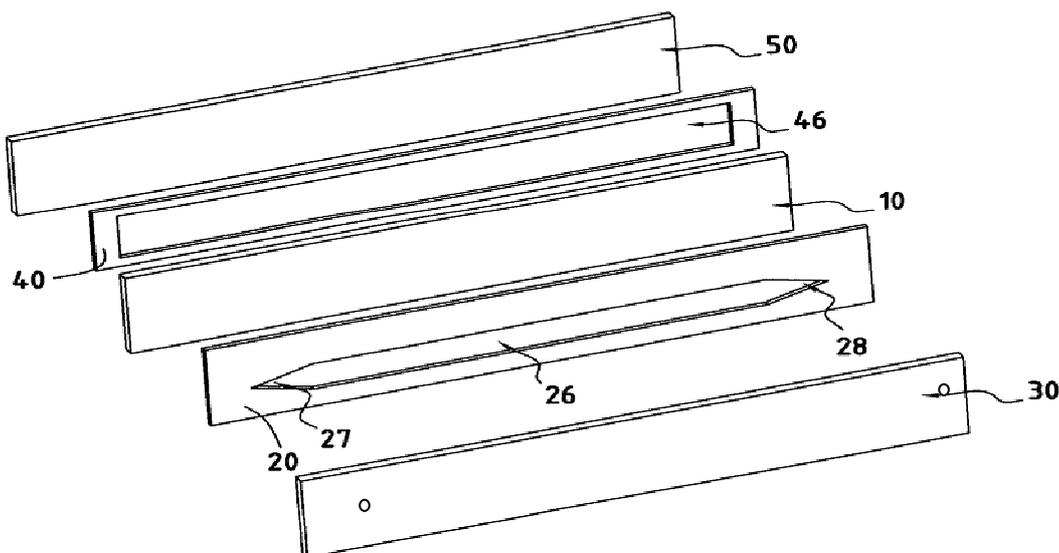


Figure M5 : disposition de la feuille de Mylar® (canal) entre les parois du canal. Légendes : 20 : canal / 27-28 : entrée-sortie du canal / 26 : volume du canal / 30 : paroi d'accumulation percée pour la fixation des tubulures Peek® au niveau des extrémités du canal / 10 : paroi de déplétion / 40 : contre canal / 46 : volume du contre canal / 50 : paroi de serrage du contre canal [326].

Au cours de ce travail, trois canaux d'épaisseurs et de dimensions différentes ont été utilisés :

- Canal A : canal de **175** μm d'épaisseur : $817 \times 13 \times 0,175$ mm avec deux extrémités en V de 50 mm de longueur. Le volume mort total du système (V_{mt}) correspond à la somme des volumes morts du canal, de l'ensemble des tubulures et des demi volumes de l'injecteur et du détecteur. Il est mesuré sur le pic d'éluion d'un composé non retenu (Benzoate de sodium 0,1g/L, détection spectrophotométrique à 254 nm). $V_{\text{mtA}} : 2149,0 \pm 5,0 \mu\text{L}$ ($n = 5$).

- Canal B : canal de **175** μm d'épaisseur : $818 \times 12 \times 0,175$ mm avec deux extrémités en V de 50 mm. $V_{\text{mtB}} : 1857,5 \pm 6,0 \mu\text{L}$ ($n = 6$).

- Canal C : canal de **125** μm d'épaisseur : $785 \times 10 \times 0,125$ mm avec deux extrémités en V de 50 mm. $V_{\text{mtC}} : 921,0 \pm 5,0 \mu\text{L}$ ($n = 6$).

Le canal est ensuite placé entre deux plaques de matière plastique (polystyrène) qui constituent les parois d'accumulation et de déplétion (parties 30 et 10, Fig. M5). Pour obtenir l'étanchéité, le serrage est assuré par un système conique [326].

La mise en rotation du bol génère un champ multi-gravitationnel perpendiculaire à la paroi du canal, champ s'exerçant vers l'extérieur du bol, de sorte que la plaque de polystyrène au contact du centre du bol devient la paroi d'accumulation. La mise en rotation, assurée par l'intermédiaire de courroie ou d'engrenage (Fig. M4), se fait grâce à un moteur électrique de type M71B4 Carpanelli (Carpanelli, Bologna, Italy). La vitesse de rotation, et donc la valeur du champ externe appliqué, sont contrôlées par une unité de pilotage Mininvert 370 (Richard Systems, Les Ullis, France).

Des orifices sont usinés dans la paroi du bol (Fig. M6) pour le passage et la fixation des tubulures Peek® d'entrée et de sortie de la phase mobile.



Figure M6 : photographie d'un orifice percé dans le bol de centrifugation permettant le passage des tubulures d'entrée et de sortie.

La fixation des tubulures est assurée par un système de serrage manuel biocompatible utilisé en chromatographie basse pression. La paroi d'accumulation est elle-même percée pour la fixation des tubulures Peek® au niveau des extrémités du canal (Fig. M5). Au contraire des autres appareillages de SdFFF, pour lesquels l'arrivée de la phase mobile et des échantillons se fait par la paroi de déplétion [2, 3], nos prototypes permettent l'introduction de la phase mobile directement par la paroi d'accumulation [326]. Ceci favorise l'utilisation de procédures simplifiées, rapides et efficaces d'injection des particules microniques dites "dans le flux", limitant ou annulant le temps de relaxation τ qui représente le temps mis par une particule pour rejoindre sa position d'équilibre (équation 1).

Pour éviter toute fuite au niveau du canal, un serrage suffisant doit être réalisé (15 à 25 Nm). Cependant, ce serrage conduit à la déformation de la paroi de déplétion vers l'intérieur du canal. La forme et le temps de rétention des pics sont alors fortement modifiés (Fig. M7).

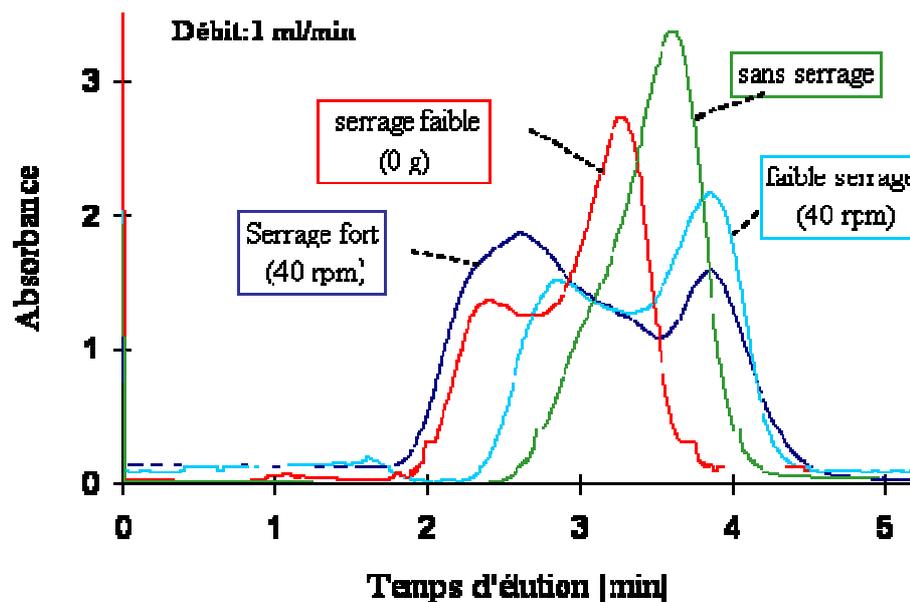
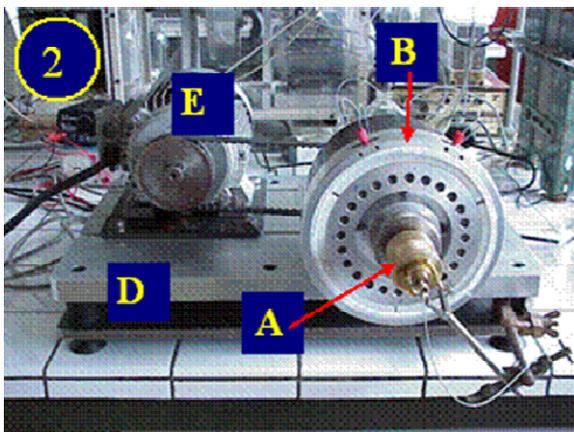
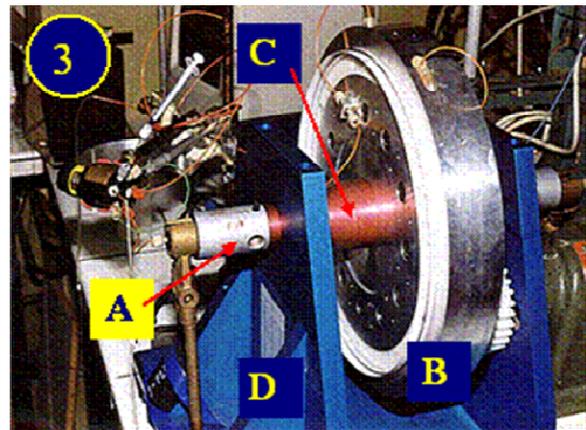
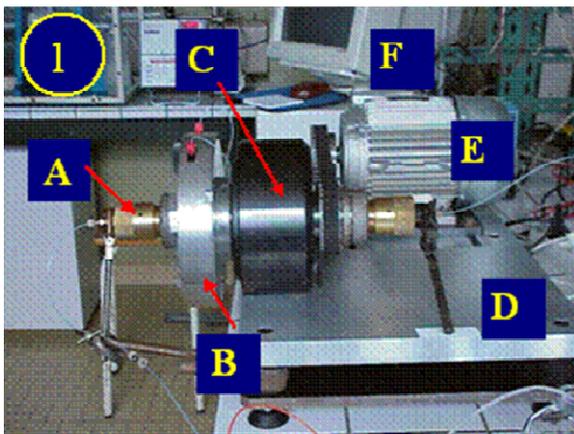


Figure M7 : effet du serrage sur la forme des pics de volume mort.

Pour pallier cet inconvénient, nous utilisons un système de contre canal parallélépipédique (parties 46 et 50, Fig. M5) de plus faible largeur et de plus grande épaisseur que le canal [326]. Placé entre la paroi de déplétion et le système de serrage, il permet d'absorber la déformation liée au serrage au centre du canal, tout en transmettant la pression à l'extérieur afin d'assurer son étanchéité. Les pics de volume mort ont un profil régulier et un volume de rétention conforme au volume mort théorique.

L'ensemble de ces améliorations ont permis la conception de prototypes performants, fiabilisés, utilisés pour la séparation d'espèces microniques et sub-microniques de haute densité. Cette phase de développement instrumental a été associée à une adaptation méthodologique pour la mise en œuvre des techniques d'analyses d'échantillons biologiques [11]. Les enseignements recueillis au cours de cette étape de développement, ont permis la production de prototype de phase-2 et 3 [326].

Cette nouvelle machine présentée sur la figure M8, est à présent assemblée et complètement fonctionnelle, au regard de l'évolution entre les deux types de prototypes :



1 et 2: prototype de phase-2

3: prototype de phase-1

A: Joints tournants.

B: Bol de centrifugation contenant le canal.

C: Axe de rotation.

D: Statif.

E: Moteur.

F: Contrôle de la rotation et acquisition du signal.

Figure M8 : comparaison entre les 2 phases de prototypes (les appareils sont photographiés sans dispositifs de protection).

D. Matériel chromatographique.

En terme d'instrumentation la SdFFF utilise, hormis la colonne qui est remplacée par le bol et le canal de séparation, l'ensemble des dispositifs retrouvés dans une chaîne de CLHP :

- pompes isocratiques double piston en opposition de phase : Waters 501 et 515 (Waters associate, Milford, MA, USA),

- vanne d'injection : vanne manuelle Rheodyne® 7125i (Rheodyne, Cotati, CA, USA),

- détecteurs UV-Vis à simple longueur d'onde : Spectroflow 783 programmable absorbance detector (ABI-Kratos, Ramsey, NJ, USA), et Waters 486 Tunable Absorbance Detector (Waters Associates),

- boîtiers d'acquisition : boîtiers 14-byte M1101 Keithley (10 ou 100 mV input / Keithley, Metrabyte) opérant à 2 Hz minimum. Les informations sont ensuite transmises à un micro-ordinateur pour être traitées : tracés des fractogrammes, calculs des moments, des valeurs de R_{obs} , etc...

II. CULTURES CELLULAIRES.

A. Lignée d'ostéosarcome humain 1547.

1. Conditions de culture.

Les cellules 1547 sont des cellules tumorales issues d'ostéosarcome humain. Ces cellules ont été aimablement cédées par Mr. Le Professeur Rigaud (Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Limoges, France) à Mr. Le Professeur Beneytout (Laboratoire de Biochimie, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges, France) avec qui nous avons étroitement collaboré.

Ces cellules adhérentes sont cultivées dans les flasques de culture de 75 cm² (Sarstedt, Marnay, France) à une densité de 4.10³ cellules/cm² dans du MEM (Minimal Essential Medium, Invitrogen, Illkrich, France) supplémenté avec 10 % de Sérum de Veau Foetal (SVF) décomplémenté (Invitrogen), 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (Invitrogen). Elles sont maintenues en culture dans un incubateur thermostaté à 37 °C sous 5% de CO₂, en atmosphère humide (95% d'humidité). Après avoir récupéré le surnageant de culture et rincé les cellules adhérentes au PBS-1X (Phosphate Buffer Saline-1X, pH = 7,4) afin d'éliminer toute trace de sérum, les cellules sont décollées des flasques par un traitement à la trypsine 2,5 % (Invitrogen) de 10 minutes à 37°C dans l'incubateur.

Les cellules sont centrifugées à 200 g pendant 5 minutes et le culot cellulaire repris dans le milieu de culture. Les numérations des cellules vivantes sont réalisées sur cellule de Malassez par le test d'exclusion au bleu Trypan (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), les cellules blanches ayant exclu le bleu étant vivantes. Les cellules sontensemencées ou utilisées à différentes densités selon les expérimentations.

2. Conditions de traitement.

Les cellules sont maintenues en culture dans des flasques 75 cm² pendant 72 heures puis traitées à la diosgénine (Sigma Aldrich) pendant 6 heures.

Une solution à 10⁻² mol/L de diosgénine est préparée par dissolution de la poudre dans de l'éthanol absolu. L'induction de l'apoptose requiert une concentration de 40.10⁻⁶ mol/L. Les cellules témoins sont traitées avec la même quantité d'éthanol absolu (< éthanol 0,1 %) pendant 6 heures.

3. Tri par SdFFF.

Préalablement au tri par SdFFF, le surnageant de culture est récupéré, pour les cellules témoin (témoin-6h) et traitées (dios 40 μ M-6h). Les cellules adhérant à la flasque sont décollées sous l'action de la trypsine et ajoutées aux cellules présentes dans le surnageant (cellules flottantes). Après centrifugation, le culot cellulaire total est resuspendu dans du PBS afin d'obtenir une suspension de $2,5 \cdot 10^6$ cellules/mL.

Les cellules sont triées par SdFFF : **PT** – pic total (de 4'50" à 8'50") et **Fn** – fractions, **F1** (de 4'50" à 5'50") - **F2** (de 6'10" à 7'30") - **F3** (de 7'50" à 8'50"). Les fractions collectées sont centrifugées et les cellules sont réensemencées dans des puits de plaques 6 puits (Nunc, Fisher Scientific Bioblock, Illkrich, France) à une densité de $4 \cdot 10^4$ cellules/puits.

B. Lignée neuroblastique humaine IMR-32.

1. Conditions de culture.

Les cellules IMR-32 sont des cellules tumorales issues de neuroblastome humain. Elles ont d'abord été cédées par Paula Lazcoz Ripoll, étudiante en thèse sous la direction du Docteur Javier Castresana (Département des sciences de la santé, Université publique de Navarre, Pampelune, Espagne) puis achetées à l'ATCC (American Type Culture Collection, LGC Promochem SARL, Molsheim, France). Ces cellules sont cultivées dans du milieu D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) GlutaMAX™ - I (Invitrogen) contenant 4500 mg/mL de glucose supplémenté avec 10 % de SVF décomplémenté (Invitrogen), 10 % d'acides aminés non essentiels (Invitrogen), 100 UI/mL de pénicilline et 100 μ g/mL de streptomycine (Invitrogen).

Les cellules sont cultivées dans des flasques de culture de 75 cm² à une densité cellulaire de $1,5 \cdot 10^4$ cellules/cm² (Falcon, Fisher Scientific Bioblock, Illkrich, France) et maintenues dans un incubateur thermostaté à 37 °C sous 5% de CO₂, en atmosphère humide (95 % d'humidité).

Après avoir récupéré le surnageant de culture et rincé les cellules adhérentes au PBS, les cellules sont décollées des flasques par un traitement au versène (0,2 g/L EDTA-tétrasodique dans du PBS, Invitrogen) de 10 minutes à 37°C dans l'incubateur. Les cellules sont centrifugées à 200 g pendant 10 minutes et le culot resuspendu dans le milieu de culture. Les numérations des cellules vivantes sont réalisées sur cellule de Malassez par le test d'exclusion au bleu Trypan (Sigma Aldrich).

2. Tri par SdFFF.

La suspension cellulaire éluée contient 2.10^6 à $2,5.10^6$ cellules/mL. Après élution, 4 fractions sont collectées, **PT** – **Pic Total** – et **Fn** – **Fractions** : **PT** (de 3'20" à 10'05") et - **F1** (de 3'20" à 4'25") - **F2** (de 5'00" à 6'45") et **F3** (de 7'20" à 10'05"). Les fractions sont centrifugées et réensemencées en chambres Lab-Tek® 8 puits permanox (Nunc) à une densité de 5.10^4 cellules/puits. Les cellules sont maintenues en culture pour différentes expérimentations ultérieures.

C. Condition de stimulation des cellules.

Les études de prolifération, de différenciation ou d'apoptose ont été réalisées après différents temps d'exposition à diverses molécules. Ces stimulations sont réalisées avant ou après tri par SdFFF. L'ensemble des conditions de stimulation est répertorié dans le tableau M1.

<i>Noms</i>	<i>Propriétés</i>	<i>Concentrations finales utilisées</i>	<i>Fournisseurs</i>	<i>Temps d'exposition</i>
diosgénine	Agent pro-apoptotique	40 μ M	Sigma Aldrich	6 h après tri (1547)
diosgénine	Agent pro-apoptotique	40 μ M	Sigma Aldrich	24 h après tri (IMR-32)
rosiglitazone	Agent différenciant	20 μ M	GlaxoSmithKline	72 h après tri (IMR-32)
Rh super Fas ligand	« super Fas ligand » recombinant humain, agent pro-apoptotique	20 et 50 ng/mL	Diaclone (Besançon, France)	24-48 h après tri (IMR-32)
7C11	Anticorps (IgM) agoniste du récepteur Fas	50 et 100 ng/mL	Immunotech, Beckman Coulter (Villepinte, France)	48 h après tri (IMR-32)
BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine)	Analogue de base, intercalant de l'ADN	50 μ M	Sigma Aldrich	24-48-72h après tri (IMR-32)

Tableau M1 : nature, propriété, concentration et temps d'incubation des principaux effecteurs utilisés.

III. ETUDE DE LA VIABILITE ET DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRES.

A. Méthode d'évaluation de la viabilité cellulaire par le test au MTT.

Le test au MTT [345] est utilisé afin d'évaluer le nombre de cellules vivantes. Le MTT [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazoliumbromure] est un sel de tétrazolium jaune, soluble qui, après réduction par une enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale, la succinate déshydrogénase se transforme en cristaux bleus de formazan, insolubles. Les cristaux de formazan formés sont solubilisés par une solution acide de sodium dodécylsulfate (SDS à 10 % en PBS, HCl 0,01 N) et la coloration bleue est quantifiable par spectrophotométrie à 550 nm (lecteur de plaques ELISA Multiskan EX, Labsystems, Cambridge, United Kingdom). Ce test est utilisé pour comparer la croissance de cellules témoins à celle de cellules traitées par diverses molécules.

Les cellules 1547 triées par SdFFF (PT et Fn) sont réensemencées dans des puits de plaques 6 puits pendant 72 h. Les cellules témoin et triées sont ensuite incubées dans leur milieu de culture avec 0,5 mg/mL de MTT pendant 4 heures dans l'étuve en atmosphère humide (37°C et 5 % de CO₂). Les cristaux de formazan sont ensuite dissous par une solution de lyse (SDS 10 %, HCl 0,01 N) et les plaques sont laissées à 37°C sur la nuit afin de libérer les cristaux de formazan formés dans les cellules. L'absorbance est mesurée à 550 nm. Les blancs analytiques correspondent à du milieu de culture contenant du MTT et la solution de lyse.

Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport à la valeur obtenue pour le puits contrôle : (Absorbance moyenne des cellules traitées / Absorbance moyenne des cellules contrôles) x 100.

B. Détection de la prolifération des cellules par incorporation de BrdU.

La bromodeoxyuridine est une homologue de la thymidine. Cette base peut être incorporée dans l'ADN au cours de la phase de réplication de l'ADN, phase S du cycle cellulaire. La BrdU est ajoutée au milieu de culture à la concentration de 50 µM. Cette étude est réalisée selon les instructions du fournisseur (Labelling and detection Kit II, Roche Diagnostics, Meylan, France).

Les cellules sont fixées au paraformaldéhyde dilué à 4% dans du PBS (PFA, Sigma Aldrich) pendant 15 min à température ambiante puis lavées 3 fois 5 min avec du PBS. Les cellules sont perméabilisées au triton sodium-citrate (Sigma Aldrich) pendant 2 min à 4°C. La préparation est rincée à nouveau 3 fois par du PBS. L'ADN cellulaire est dénaturé par du HCl 2N (Sigma Aldrich), pendant 1 h à température ambiante. L'acide chlorhydrique est ensuite neutralisé par un tampon borate 0,1 M durant 10 minutes. Après 3 lavages de 5 minutes au PBS, la solution d'anticorps monoclonal de souris anti-BrdU (1/100 en PBS, Sigma Aldrich) est incubée 30 min à température ambiante. Les cellules sont lavées 3 fois 5 min avec du PBS puis l'anticorps secondaire anti-Ig de souris, Alexa Fluor 488 (1/4500 en PBS, Molecular Probes, Leiden, Netherlands) est incubé pendant 30 min à température ambiante. Les cellules sont lavées au PBS puis contre colorées pendant 10 min au bleu Evans (fluorescence rouge des corps cellulaires, Sigma Aldrich). La préparation est montée entre lame et lamelle en glycérol-gélatine (Sigma Aldrich). L'observation est effectuée au microscope à fluorescence (Leica DMRX muni d'une caméra DFC 300 FX, Rueil-Malmaison, France).

C. Étude de la morphologie des cellules traitées à la diosgénine par microscopie optique à contraste de phase.

La morphologie des cellules traitées ou non à la diosgénine 40 μ M pendant 6 h a été observée en microscopie optique à contraste de phase (objectifs $\times 10$ et $\times 40$). Les cellules ensemencées comme précédemment décrit sont observées au microscope et prises en photos avec un dispositif d'acquisition d'image numérique (Nikon, Champigny-sur-Marne, France).

IV. DÉTECTION DE LA MORT CELLULAIRE.

A. Détection de la libération des nucléosomes solubles par la méthode E.L.I.S.A.

La proportion de cellules en apoptose induite par la diosgénine à 40 μM pendant 6 h sur les cellules 1547 a été évaluée par le dosage des nucléosomes solubles. Lors de l'apoptose, la chromatine se fragmente conduisant à la formation de nucléosomes libérés dans le milieu. Ce dosage a été réalisé par la technique immuno-enzymatique, E.L.I.S.A. (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) d'après les instructions données par le fournisseur du kit Cell Death Detection ELISA^{Plus} (Roche Diagnostic, Meylan, France).

Après avoir trié les cellules par SdFFF, les fractions et les cellules témoins sont ensemencées en plaques 6 puits à 4.10^4 cellules / puits et maintenues en culture pendant 72 h dans leur milieu de culture. Le surnageant et les cellules adhérentes décollées par un traitement à la trypsine, sont centrifugés à 200 g pendant 10 minutes. Les culots cellulaires sont repris dans du tampon de lyse (4 mL/ 10^6 cellules) pendant 30 min à température ambiante. Les lysats cellulaires sont ensuite centrifugés, 10 min à 200 g, à 4°C. Cela aura comme effet de culoter les débris cellulaires, les nucléosomes se trouvant quant à eux dans le surnageant. 20 μL du surnageant de chaque condition sont alors ajoutés dans des puits tapissés de streptavidine. 80 μL / puits d'immuno-réactif contenant deux anticorps, 1 anti-histone couplé à la biotine et 1 anti-ADN couplé à la peroxydase (la POD ou Horse-Radish Peroxydase). L'ensemble des composants est incubé 2 h à température ambiante sous agitation lente. Au cours de l'incubation, les mono- et les oligonucléosomes formés lors de la fragmentation de l'ADN sont complexés avec les anticorps anti-ADN et anti-histones, ces derniers étant capturés au fond des puits par la streptavidine (complexe streptavidine / biotine).

Après avoir ôté délicatement la solution, trois lavages sont réalisés. Le substrat de la peroxydase, l'ABTS (2-2'-azino-di-[3-éthylbenzothiazoline sulfonate] est alors ajouté et incubé pendant 15 min sous agitation à température ambiante et à l'abri de la lumière. La quantité d'ABTS oxydé (la réaction enzymatique donne une coloration verte), correspondant à la quantité d'ADN fragmenté, est mesurée à 405 nm (ELISA Multiskan EX, Labsystems). Le blanc analytique est obtenu par la solution d'ABTS, lue à 490 nm, longueur d'onde de référence.

Les valeurs moyennes d'absorbance (valeurs à 405 nm auxquelles sont retranchées les valeurs à 490 nm) sont ensuite calculées. Un contrapole positif est fourni dans le kit. Lorsque l'on

teste les effets apoptotiques d'une drogue et que l'on quantifie l'apoptose par ce test, il est primordial de le faire également sur des cellules témoins. Ainsi, nous pouvons déterminer l'apoptose basale présente au sein de ces cellules.

B. Mise en évidence de l'apoptose par la méthode TUNEL.

Les cellules ont étéensemencées dans des chambres de culture (Lab-Tek[®] 8 puits permanox, Nunc, 10⁵ cellules/puits) et laissées pendant 72 h dans leur milieu de culture avant d'être stimulées avec différentes molécules. La présence d'apoptose est évaluée par la méthode TUNEL (TdT-Mediated dUTP-Nick End Labeling) selon les instructions du fournisseur (Promega, Charbonnières, France).

Les cellules sont fixées par du PFA dilué à 4 % dans du PBS et perméabilisées pendant 5 min à 4°C par du Triton X100 (Invitrogen) dilué à 0,1 % dans du PBS. Les cellules sont ensuite lavées au PBS. Après 10 min de mise en contact avec le tampon d'équilibration (fourni dans le kit), les cellules sont incubées 1 h à 37°C et à l'obscurité avec une solution de polymères nucléotidiques conjugués à la fluorescéine contenant la terminale-deoxynucléotidyl-transférase. Cette enzyme va catalyser la liaison de polymères nucléotidiques fluorescents à l'extrémité 3'OH libre des brins d'ADN générés au cours de l'apoptose.

La réaction est arrêtée par incubation des cellules pendant 10 min dans une solution SSC 2X (Saline Sodium Citrate). Après lavage en PBS, on réalise une contre-coloration au bleu-Evans (10 min, Sigma Aldrich). Après plusieurs lavages en PBS et un lavage à l'eau, les cellules sont fixées entre lame et lamelle en glycérol-gélatine (Sigma Aldrich). Toutes les cellules fluorescent en rouge avec pour les cellules apoptotiques une fluorescence verte au niveau du noyau. Les cellules en apoptose sont alors comptées (au moins 3 champs par condition et 300 cellules par essai) avec un microscope à fluorescence (x 200, Carl Zeiss S.A.S, LSM, Jena, Allemagne). L'index apoptotique des cellules est déterminé pour chacune des conditions par rapport à l'état basal qui est arbitrairement fixé à 1.

C. Mise en évidence de l'apoptose par Annexine V-FITC et cytométrie en flux.

Le kit ANNEXIN V-FITC (Beckman Coulter, Paris, France) utilise une technique de détection de l'apoptose basée sur la capacité de fixation de l'annexine V sur les phosphatidylsérines (PS) et sur la capacité de l'iodure de propidium (IP) à s'intercaler dans l'ADN.

Au cours du phénomène d'apoptose, la cellule subit de nombreuses modifications morphologiques, biologiques et biochimiques. Parmi ces changements, un « flip-flop » membranaire est observé à la surface des cellules provoquant l'externalisation de phospholipides chargés négativement, les PS habituellement enchâssées à l'intérieur de la bicouche lipidique. Ce phénomène apparaît précocement au cours de l'apoptose et l'intégrité membranaire des cellules est maintenue.

Le kit utilise la capacité de l'annexine V de se lier spécifiquement aux PS en présence de calcium. L'annexine V étant couplé au FITC (isothiocyanate de fluoresceine), une mesure du nombre de cellules en apoptose grâce à la mesure de l'intensité moyenne de fluorescence par la technique de cytométrie en flux.

L'iodure de propidium est également utilisé pour mettre en évidence des cellules dont l'intégrité membranaire est perturbée. En effet l'IP ne peut pénétrer dans la cellule et s'intercaler dans l'ADN que si la membrane est perforée, ce qui est le cas pour les cellules mortes par nécrose ou à un stade très avancé d'apoptose (nécrose post apoptotique).

Les cellules sont remises en suspension dans le tampon 1X fourni dans le kit à la concentration de $5 \cdot 10^5$ à $5 \cdot 10^6$ cellules / mL. Sont ensuite ajoutés [1 μ L d'annexine V-FITC + 5 μ L d'IP] à 100 μ L de suspension cellulaire. Après 15 min d'incubation à 4°C, on rajoute 400 μ L de tampon 1X afin d'obtenir un volume suffisant pour l'analyse par cytométrie en flux (cytomics FC200, Beckman Coulter, France).

V. IMMUNOCYTOCHIMIE PAR IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE.

A. Principe.

L'expression de protéines, à l'état basal ou dans différentes conditions de stimulation, a été étudiée par immunofluorescence sur la lignée neuroblastique IMR-32. Les cellules (témoins et éluées), à raison de 10^4 ou 10^5 cellules par puits, ont étéensemencées en chambres 8 puits (Lab-Tek[®] permanox , Nunc). Après différents temps de remise en culture, le milieu de culture est alors retiré et les cellules sont fixées grâce à une solution de PFA à 4% (Sigma Aldrich) dans du PBS pendant 30 min.

Les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS, et sont perméabilisées par une solution d'alcool/acétone (50/50 v/v, Sigma Aldrich) ou de Triton X-100 à 0,1 % (Invitrogen) dans du PBS pendant 5 minutes à 4°C, afin de permettre la détection d'antigènes intra-cellulaires. Trois rinçages en PBS sont réalisés. Une saturation des sites de fixation non spécifiques est réalisée par incubation des cellules avec une solution de sérum de chèvre (Sigma Aldrich) dilué à 10 % dans du PBS ou de Bovin Serum Albumin (BSA) dilué à 4 % dans du PBS pendant 2 heures à température ambiante. Les cellules sont alors lavées 3 fois en PBS puis incubées avec des anticorps primaires dilués dans la solution de saturation. Cette incubation peut se faire à température ambiante pendant 90 minutes ou sur la nuit à 4°C et sous agitation lente.

Les anticorps primaires utilisés, leur spécificité, leur dilution et les fournisseurs sont répertoriés dans le tableau M2.

<i>Noms</i>	<i>Spécificité</i>	<i>Hôtes</i>	<i>Isotypes</i>	<i>Fournisseurs</i>	<i>Dilutions utilisées</i>	<i>Propriétés</i>
N-CAM	Molécule d'adhésion cellulaire neuronale (N-CAM)	souris	IgG1	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)	1/50	Marqueur des cellules neuronales
NKH1-RD1	N-CAM	souris	IgG1	Coulter Clone	1/75	N-CAM couplé à la Phycoerythrine (PE)
2F11	Neurofilament	souris	IgG1	Dako cytotation (Trappes, France)	1/50	Marqueur des cellules neuronales
PSA-N-CAM	N-CAM polysialylée	souris	IgM	Abcys (Paris, France)	1/200	Marqueur des cellules neuronales en migration
Nestine	Filaments intermédiaires	souris	IgG	Santa Cruz Biotechnology	1/20	Marqueur des progéniteurs du SNC
Vimentine	Filaments intermédiaires du cytosquelette	souris	IgG ₁	Santa Cruz Biotechnology	1/50	Marqueur des progéniteurs du SNC
BG-27	Fas humain	souris	IgG2a	Diaclone	1/50	Partie intracellulaire du récepteur Fas
GFAP	Protéine gliale fibrillaire acide	lapin	polyclonaux	Santa Cruz Biotechnology	1/400	Marqueur des astrocytes
TrK A	Tyrosine Kinase Récepteur A	lapin	polyclonaux	Santa Cruz Biotechnology	1/200	Récepteur aux neurotrophines
TrK B	Tyrosine Kinase Récepteur B	lapin	polyclonaux	Santa Cruz Biotechnology	1/200	Récepteur aux neurotrophines
BrdU	Bromodesoxyuridine	souris	IgG	Sigma Aldrich	1/100	Analogue de base d'ADN, marqueur de prolifération
BZ1		souris	IgG2a	Diaclone	Variable	Contrôle isotypique
BZ2		souris	IgG1	Diaclone	Variable	Contrôle isotypique
Irrelevant de lapin		lapin	IgG	Santa Cruz Biotechnology	Variable	Contrôle isotypique

Tableau M2: liste des anticorps primaires utilisés en immunocytochimie par immunofluorescence indirecte.

Après 3 lavages au PBS, les anticorps secondaires anti-Ig de souris ou de lapin couplés à un fluorochrome (Tableau M3), sont incubés avec les cellules pendant 30 min à température ambiante.

<i>Spécificité</i>	<i>Hôtes</i>	<i>fluorochrome</i>	<i>Fournisseurs</i>	<i>Dilutions utilisées</i>
Ig totales de souris	chèvre	Alexa fluor 488	Molecular Probes (Leiden, Pays-Bas)	1/4500 ou 1/9000
Ig totales de souris	chèvre	Alexa fluor 594	Molecular Probes	1/4500 ou 1/9000
Ig totales de lapin	chèvre	Alexa fluor 488	Molecular Probes	1/4500 ou 1/9000
Ig totales de lapin	chèvre	Alexa fluor 594	Molecular Probes	1/4500 ou 1/9000

Tableau M3 : liste des anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte.

Enfin, les cellules sont lavées par du PBS, 3 fois 20 min, rapidement rincées à l'eau puis fixées au glycérol-gélatine (Sigma Aldrich) entre lame et lamelle. Les lames sont observées grâce à un microscope à fluorescence (Leica DMRX).

B. Les contrôles.

Un contrôle isotypique est effectué pour chaque anticorps primaire, avec selon les cas, des immunoglobulines Ig irrelevantes, IgG1 ou IgG2a purifiées chez la souris ou une fraction purifiée d'IgG de lapin.

De même, un contrôle systématique de chaque anticorps secondaire a été effectué afin de vérifier l'absence de fixation non spécifique. Pour cela, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire, sans incubation préalable à un anticorps primaire.

VI. COMPTEUR DE PARTICULES COULTER COUNTER[®].

A. Principe.

Le Coulter multisizer II (256 channel Multisizer II, Beckman Coulter, Fullerton, CA) est un analyseur multi-canal de dimension particulaire. Cette technique est basée sur l'utilisation de l'impédance électrique permettant l'étude d'une distribution de tailles des particules allant de 0,4 à 1200 μm . Le principe de cet appareil est basé sur la variation de résistance provoquée par des particules (cellules, amidons) placées dans un champ électrique. La résistance est mesurée entre deux électrodes placées de part et d'autre d'un orifice calibré (70 μm) à travers lequel les particules sont aspirées (Fig. 9). A chaque passage d'une particule, elle déplace son propre volume d'électrolytes et génère un signal proportionnel à ce volume. L'unité de traitement des données produit, ensuite, directement sous forme graphique et / ou numérique, une distribution granulométrique en diamètre équivalent volume. Un dispositif manométrique permet de mesurer le volume de liquide aspiré et ainsi de connaître la concentration des particules dans l'échantillon en nombre ou en volume. Le diamètre équivalent-volume est, en fait, le diamètre de la particule théorique se comportant de la même manière que la particule considérée réelle et qui, elle, n'est pas forcément sphérique. Pour chaque population étudiée, on obtient une valeur de distribution de taille permettant le calcul du diamètre moyen. Celle-ci est obtenue sur le cumul de deux aspirations du même échantillon (500 μL / essai). Les résultats sont fournis en terme de moyenne de diamètre moyen mesuré sur trois expérimentations indépendantes. Le tube orifice utilisé présente une ouverture de 70 μm dont la calibration a été réalisée par l'utilisation de billes de latex certifiées de $6.992 \pm 0.050 \mu\text{m}$ (1.0% CV, Duke Scientific, Palo Alto, CA, USA).

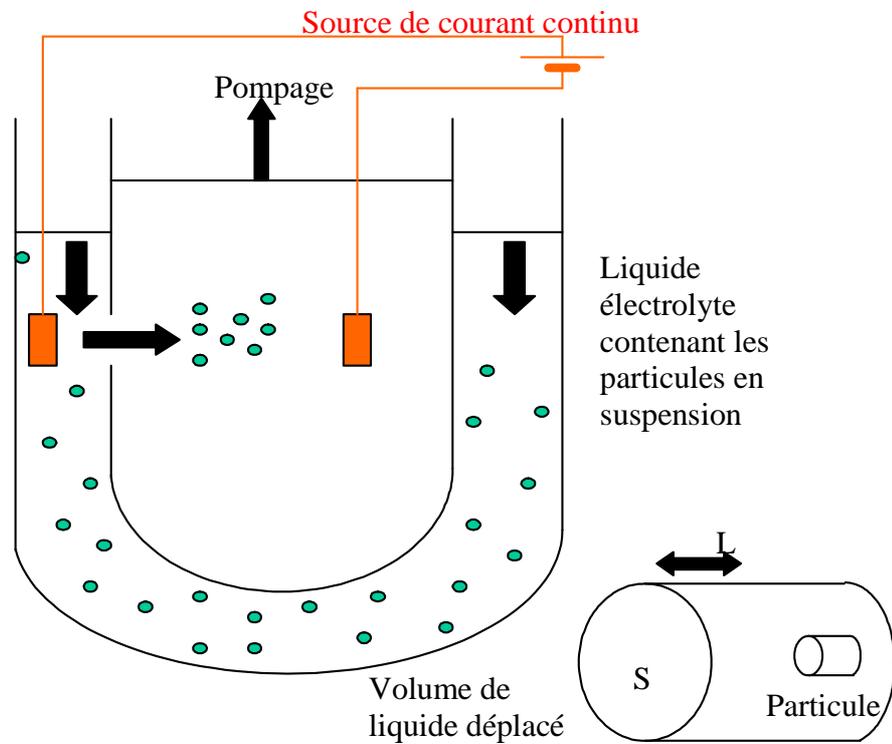


Figure M9 : principe d'aspiration, de détection et de comptage des particules par Coulter Counter.



RESULTATS / DISCUSSION

I. SUIVI (MONITORING) PAR SdFFF DE L'HYDROLYSE α -AMYLOSIQUE DES AMIDONS DE RIZ ET DE BLE

La digestion enzymatique est une mise en œuvre méthodologique du tri de particules microniques. Le mode « Hyperlayer » a pu s'appliquer au monitoring et au tri de populations complexes. Cette étude m'a permis d'appréhender les conditions d'élution en mode Hyperlayer, de maîtriser la collection de fractions permettant ensuite l'exploration des mécanismes de l'hydrolyse enzymatique.

Comme cela a été décrit (p.75), la SdFFF peut être utilisée afin de suivre et de caractériser un événement biologique (monitoring). L'une des premières étapes d'analyse par cette méthode a concerné le suivi de la dégradation enzymatique de l'amidon de riz natif par une α -amylase, à basse température [341]. L'amidon représente l'une des principales sources énergétiques au plan mondial, et sa dégradation enzymatique en glucose, maltose ou malto-polyosides par des α - et β -amylases constitue l'une des plus importantes réactions mises en œuvre dans l'industrie agroalimentaire (panification, fermentation, brasserie,...) et chimique (amidons modifiés) [346-350]. L'étude de cette réaction fait l'objet d'un nombre important de publications annuelles, qui concernent essentiellement la dégradation enzymatique d'amidons préalablement modifiés et partiellement hydrolysés : hydrolyse acide à forte température ($> 95^{\circ}\text{C}$) par exemple. Dans le contexte de sauvegarde des ressources en eau et en énergie [351], l'étude de la dégradation enzymatique des amidons natifs à basse température (30 à 45°C) fait l'objet d'un nombre croissant de travaux [352, 353]. Les études menées sur l'amidon de riz [341] ont montré une corrélation entre la cinétique de dégradation et l'évolution des profils d'élution de l'amidon (fractogrammes : variation de R_{obs} et de $\text{Absorbance}_{\text{max}}$).

Ainsi après cette étape de calibration, la SdFFF apparaît comme un outil permettant, par le simple enregistrement des fractogrammes, le suivi de cette réaction. Ceci est rendu possible par la capacité du système à trier les particules en fonction de leur taille et de leur densité [341, 354]. En même temps que le monitoring, la potentialité offerte par la SdFFF de collecter des fractions de l'échantillon permet, par le suivi de la variation de la taille moyenne des granules élués dans chaque fraction (analyse par cytométrie en flux et par Coulter Counter®), de mieux comprendre l'impact de l'activité enzymatique sur la balance taille / densité [341, 354]. La SdFFF aide également à l'exploration du mécanisme d'hydrolyse enzymatique [341, 354]. Une première étude a concerné un

amidon dit monomodale, l'amidon de riz [349, 354, 355], ce qui implique que les grains ~~Résillon~~ présentent une distribution de taille homogène autour d'une valeur moyenne, comme cela est le cas pour les amidons de maïs ou de pomme de terre [349, 354, 355]. Certains amidons, tels que ceux du blé ou de l'orge, au contraire présentent une distribution de taille bimodale de leurs granules en deux populations principales : une population de granules A de taille $> 20\mu\text{m}$, qui représente 10% de la population et 90 % du volume ; et une population de granules B de taille $< 10\mu\text{m}$, qui représente 90% de la population mais 10 % du volume [332, 349, 351, 354-357].

L'objet de ce premier travail de thèse a été d'utiliser les capacités de la SdFFF pour le suivi de la dégradation enzymatique d'amidons de riz et de blé natifs par une α -amylase à basse température. La collection de fractions et le suivi de leurs variations de tailles devraient permettre de mieux comprendre le mécanisme d'hydrolyse enzymatique spécifiquement impliqué pour chacune des populations de granules présentes.

A. Sedimentation Field Flow Fractionation Monitoring of Rice Starch Amylolysis.

X. MORELON, S. BATTU*, C. SALESSE, G. BEGAUD-GRIMAUD, D. CLEDAT, and P.J.P. CARDOT.

Journal of Chromatography A, 1093 (2005) 147-155.

Laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges,
2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges Cedex, France.

* Corresponding author:

Tel.: + 33-5-5543-5979.

Fax: + 33-5-5543-5859.

E-mail: battu@pharma.unilim.fr

Keywords: Sedimentation Field Flow Fractionation, native starch, amylase.

1. Abstract.

Enzymatic starch granule hydrolysis is one of the most important reactions in many industrial processes. In this work, we investigated the capacity of SdFFF to monitor the native rice starch amylolysis. In order to determine if fractogram changes observed were correlated to granule biophysical modifications which occurred during amylolysis, SdFFF separation was associated with particle size distribution analysis. The results showed that SdFFF is an effective tool to monitor amylolysis of native rice starch. SdFFF analysis was a rapid (less than 10 min), simple and specific method to follow biophysical modifications of starch granules. These results suggested many different applications such as testing series of enzymes and starches. By using sub-population sorting, SdFFF could be also used to better understand starch hydrolysis mechanisms or starch granule structure.

B. Sedimentation Field Flow Fractionation Monitoring of Bimodal Wheat Starch Amylolysis.

C. SALESSE[°], S. BATTU^{°*}, G. BEGAUD-GRIMAUD[°], D. CLEDAT[°], J. COOK-MOREAU⁺ and
P.J.P. CARDOT[°].

Journal of Chromatography A, 1129 (2006) 247–254

[°] Laboratoire de Chimie Analytique, EA 3842 "Homéostasie Cellulaire & Pathologies", Université de Limoges, Faculté de Pharmacie, 2 rue du Dr Marcland 87025 Limoges Cedex. France.

⁺ Laboratoire de Biochimie Médicale, EA 3839 "Médecine Moléculaire Humaine", Université de Limoges, Faculté de Médecine, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges Cedex, France.

* Corresponding author:

Tel.: + 33-5-5543-5979.

Fax: + 33-5-5543-5858.

E-mail: battu@pharma.unilim.fr

Keywords: Sedimentation Field Flow Fractionation, native starch, amylase, amyloysis.

1. Abstract.

Enzymatic starch granule hydrolysis is one of the most important reactions in many industrial processes. In this study, we investigated the capacity of SdFFF to monitor the amyloysis of a bimodal starch population: native wheat starch. Results demonstrated a correlation between fractogram changes and enzymatic hydrolysis. Furthermore, SdFFF was used to sort subpopulations which enhanced the study of granule size distribution changes occurring during amyloysis. These results show the interest in coupling SdFFF with particle size measurement methods to study complex starch size/density modifications associated to hydrolysis. These results suggested different applications such as the association of SdFFF with structural investigations to better understand the specific mechanisms of amyloysis or starch granule structure.

C. Discussion / Conclusion.

Lindeboom et al. [354] ont suggéré dans une revue récente que la FFF de sédimentation pouvait être un outil de choix pour l'étude de la réaction amylolytique par sa capacité à tenir compte des variations de taille et de densité liées au mécanisme d'action des enzymes impliquées. Ces études démontrent la capacité de la SdFFF à suivre la cinétique enzymatique par le seul enregistrement des fractogrammes en comparaison du profil témoin [327, 341]. On voit nettement (Fig. RI-3 et RII-5), une disparition précoce et rapide du pic des amidons de type B, qui sont les plus sensibles à l'attaque enzymatique [354]. Contrairement à ce que l'on observe pour l'amidon de riz (Table RI-I) [341], en ce qui concerne les granules de type B du blé on ne note pas de variation significative des temps de rétention et donc de R_{obs} (Table RII-I).

A la confirmation des capacités de monitoring d'une réaction enzymatique s'ajoute ici, celle de l'exploration du mécanisme enzymatique par l'association : élution calibrée / collection de fractions / analyses de taille des granules élués [327, 341]. Comme nous l'avons démontré dans la partie consacrée au mode d'élution (p. 10, § 2), la rétention à champ et débit constants dépend, dans le mode « Hyperlayer », principalement de la taille et de la densité [2-4, 14, 17-25]. La collection de fractions (Figs. RI-3, -4 et -5 ; RII-3 et -5, -6 et -7) permet de façon orthogonale :

- l'analyse de la distribution de taille des particules éluées dans chaque fraction (mesure de la taille moyenne). Cela aboutit à la reconstitution de la distribution de taille dans le fractogramme (Figs. RI-4 et 5; RII-3, -6 et -7) ;

- l'analyse de la variation de densité. La corrélation entre variation du diamètre moyen et R_{obs} permet alors de déterminer si l'hydrolyse se produit à densité constante ou non. Il faut rappeler que selon le mode « Hyperlayer », à densité égale, les particules les plus grandes génèrent le plus de forces hydrodynamiques et sont situées plus haut dans le canal. Elles sont éluées avant les particules de plus faible diamètre. A taille égale, les particules les plus denses sont plus sensibles au champ de gravité et sont éluées en dernier. Dans une population de forte polydispersité en taille et densité, comme le sont les amidons, les particules les plus grandes et les moins denses seront éluées en premier, alors que les plus petites et les plus denses le seront en dernier [2-4, 14, 17-25].

Ceci permet l'étude cinétique de la lyse enzymatique des deux principales populations d'amidon (granules A et B).

L'amidon de riz présente une distribution de taille monomodale centrée autour d'une valeur moyenne de $4,95 \pm 0,15 \mu\text{m}$ ($n = 3$), comme cela est décrit dans la littérature [33, 356] (Fig. RI-4). L'analyse de la distribution de taille des particules éluées dans le fractogramme montre, pour des particules microniques, éluées en mode Hyperlayer, un ordre d'éluion inverse à leur taille (Fig. RI-5). Les granules de petite taille sont élués en premier démontrant une éluion dépendante de la densité (F1 à F3, Fig. RI-4 et 5). L'utilisation d'un champ multigravitationnel (SdFFF) démontre clairement la polydispersité en taille et en densité de la population d'amidon, confirmant la présence de particules petites et légères. Leur existence avait été précédemment évoquée en GFFF (gravité terrestre) du fait de leur éluion concomitante au volume mort, [376, 377].

L'analyse des amidons soumis à l'attaque enzymatique confirme ces résultats (Fig. RI-5). Les particules les plus petites sont bien éluées avant celles de plus grande taille. En présence d'enzyme, l'analyse de la population totale (Fig. RI-5) montre une diminution significative de taille moyenne des grains d'amidon ($\approx 1,5 \mu\text{m}$). L'analyse des fractions collectées montre en fait que les particules de plus grande taille (F3) sont attaquées préférentiellement ($-1,25 \mu\text{m}$ en 2 heures d'incubation) (Fig. RI-5). Leur érosion se traduit par une diminution de diamètre et leur éluion en F4 et F5 (diminution du t_r du pic de SdFFF). Pour cette dernière fraction, on note une diminution significative de diamètre qu'après 20 heures d'incubation. Cela ne signifie pas que les particules initialement éluées en F4 et F5 ne subissent pas l'hydrolyse, mais l'effet d'érosion est masqué par le passage des particules de F3 érodées vers F4 puis F5 en fonction du degré d'attaque enzymatique. L'hydrolyse enzymatique se poursuivant, les grains d'amidons deviennent progressivement de plus en plus poreux et hydrophiles par attaque périphérique. Ceci induit leur solubilisation lorsque leur taille est suffisamment petite et leur structure cristalline suffisamment détruite. La diminution de taille des particules s'associe finalement à leur diminution de densité. Ainsi, les particules issues de F3/F4/F5 sont finalement éluées en F2 et F1. Ce phénomène est observable au niveau des fractions F1 et F2 (Fig. RI-5) où l'on note une augmentation de taille des particules éluées. La solubilisation des particules est notamment visible par l'augmentation du pic de volume mort.

Ceci apparaît comme étant conforme avec le mécanisme classiquement décrit pour l'hydrolyse enzymatique des granules de petite taille [341, 347, 354, 365, 398]. Après fixation de l'enzyme sur les imperfections du grain d'amidon, celle-ci produit une érosion périphérique à l'origine de la diminution de taille que l'on a mesurée. Les granules obtenus sont de forme irrégulière, dont le cœur devient accessible à l'eau, aboutissant à leur fragmentation et à leur dissolution. Cette solubilisation conduit à une diminution de densité qui contrebalance l'effet de réduction de taille sur les fractogrammes : $R_{\text{obs}} \approx \text{constante}$ au-delà de 20 h d'incubation (Tableau RI-2).

Concernant les granules de type B de l'amidon de blé ($< 10 \mu\text{m}$), s'ils constituent la population unique du second pic du fractogramme (Figs. RII-1 et -5), ils sont également co-élus dans le pic des granules A selon un mode dépendant de la densité, comme cela a été décrit pour l'amidon de riz (Figs. RI-4 et -5) [341, 376, 377].

L'attaque enzymatique produit une diminution significative de la taille de ces granules, aussi bien dans la population totale que pour ceux élués dans les fractions F5 et F6 (Figs RI-4 et -5, RII-4, -5 et -7). Cette diminution de taille n'est pas associée à la diminution de R_{obs} (augmentation de t_r) comme cela était attendu (diminution des forces ascensionnelles). Au contraire un accroissement de taille des particules B co-élues dans le premier pic du fractogramme est à noter. Ceci apparaît là encore comme étant conforme avec le mécanisme décrit pour l'hydrolyse enzymatique des granules de petite taille [341, 347, 354, 365, 398]. Celle-ci produit une érosion périphérique à l'origine de la diminution de taille que l'on a mesurée. On obtient des particules de formes irrégulières, dont le cœur devient accessible à l'eau conduisant à la fragmentation et à la dissolution du granule. Cette solubilisation conduit à une diminution de densité qui contrebalance l'effet de réduction de taille sur les fractogrammes : $R_{\text{obs}} \approx \text{constante}$. La fragmentation progressive associée à la diminution de densité permet d'expliquer l'apparition de particules de taille croissante dans les fractions F1 à F4 au cours du temps d'incubation. Il s'agit des résidus non solubilisés de faible densité, issus de l'érosion périphérique et de la fragmentation des granules élués initialement dans les fractions F5 et F6.

Concernant les granules A, ceux-ci subissent une attaque plus tardive et limitée que les granules de type B (Figs. RII-4 et -6) [354]. La diminution de taille, visible sur la population totale, reste limitée dans les fractions (Fig. RII-7). Seules les particules les plus grandes présentent une érosion marquée et ce seulement après 20 à 30 h d'incubation. Cela reflète l'érosion périphérique limitée constatée pour ce type de granule [341, 347, 354, 365, 398]. Là encore, nous n'observons pas de diminution significative de R_{obs} alors que la diminution de taille atteint 16% sur la population totale. L'analyse des fractions montre, en particulier, que la diminution de taille des granules élués en F1 produit des particules de même taille que celles initialement éluées en F2. Là encore, comme pour les granules B, la seule explication possible d'une rétention constante à taille réduite, réside dans la prise en compte d'une diminution compensatrice de densité. Cela est en parfaite corrélation avec le mécanisme d'hydrolyse [346, 347, 354, 359, 363-365, 385, 398]. Depuis son point d'attache, l' α -amylase perce des tunnels dans le grain d'amidon en direction du cœur du granule, produisant des amidons poreux (attaque centripète). L'enzyme digère alors le cœur du granule en direction de l'extérieur (attaque centrifuge), produisant une coque vide qui se fragmente et se solubilise.

En conclusion, la SdFFF apparaît comme une méthode efficace pour le suivi de la dégradation enzymatique des amidons mono- et bimodaux. La collection des fractions permet une exploration plus précise de cette cinétique. Ceci ouvre un nombre important de perspectives telles que l'utilisation de la technique pour le « screening » d'enzymes, d'amidons et de conditions d'hydrolyse diverses. L'association de la SdFFF avec des techniques spécifiques d'analyse structurale des grains : diffraction des rayons X, balayage différentiel calorimétrique, microscopie électronique à balayage ou à transmission, analyse de densité; permettrait de mieux comprendre les mécanismes enzymatiques ou la structure des grains d'amidon.

II. ISOLEMENT DE CELLULES PRE-APOPTOTIQUES. INFLUENCE DE L'ÉPAISSEUR DU CANAL SUR L'EFFICACITÉ DU TRI CELLULAIRE.

Cette étude représente l'une des étapes fondamentales de l'intégration de la SdFFF dans le domaine de l'oncologie (p. 73, § 1.4.1.). Les premières applications ont mise en œuvre la méthode comme outil de suivi et de caractérisation d'événements biologiques tels que la digestion enzymatique des amidons [327, 341], ou l'induction d'apoptose et de différenciation dans des lignées cancéreuses [130, 213]. Ces dernières ont démontré une corrélation directe entre l'induction d'événement biologique et la variation des profils d'élution en terme de forme de pic ou de facteur de rétention (R_{obs}) (Fig. 26). Ces études [130, 213], suggèrent entre autres applications l'utilisation de la SdFFF comme outil de tri cellulaire, en association au monitoring, afin d'isoler des sous-populations d'intérêt telles que des cellules apoptotiques ou différenciées [31, 32]. Comme nous l'avons décrit, l'apoptose est un mécanisme complexe et plurifactoriel impliquant une grande variété de mécanismes et de voies de signalisation. Sa dérégulation est à l'origine de la prolifération des cellules cancéreuses. L'isolement de telles cellules n'est alors intéressant que s'il permet soit l'amélioration de la sensibilité des tests spécifiques de diagnostic de l'état apoptotique, soit de produire une population sur laquelle il devient possible de suivre, de façon spécifique, la cinétique et la signalisation apoptotiques. Ceci correspond aux cellules dites pré-apoptotiques, c'est-à-dire la population au stade précoce du processus.

Le modèle d'étude est celui de l'induction de l'apoptose, par la diosgénine à 40 μM , dans la lignée d'ostéosarcome humain 1547. Les études précédentes réalisées au sein du laboratoire sur le même modèle [130], montrent une variation significative des profils d'élution dès 6h d'incubation (Fig. 26). Le tri sera réalisé sur cette population traitée. Les cellules sont ensuite remises en culture en absence de diosgénine. L'agent inducteur est éliminé par un processus de lavage (washout) qui permet l'observation du phénomène induit, et sa cinétique, sans nouvelle interférence avec celui-ci. L'analyse des populations triées se fera après 72 h de culture afin de laisser le processus apoptotique parvenir à son terme.

L'induction d'apoptose s'accompagne de variations importantes et complexes de la taille et de la densité cellulaires [31, 130], se traduisant par des évolutions spécifiques des profils d'élution. Afin d'améliorer le tri des cellules pré-apoptotiques, nous avons mis en œuvre et comparé deux systèmes d'élution, variant par l'épaisseur du canal utilisé : 125 μm et 175 μm d'épaisseur. Comme

nous l'avons décrit précédemment (équations 5 et 6, p. 11), une faible épaisseur favorise les forces ascensionnelles et donc un tri basé sur la taille (équation 4), alors qu'une augmentation d'épaisseur permet, au contraire, une meilleure prise en charge des variations de densité en privilégiant les forces gravitationnelles.

A. Pre-apoptotic sub-population cell sorting from diosgenin apoptosis induced 1547 cells by Sedimentation Field-Flow Fractionation. The effect of channel thickness on sorting performance.

G. Bégaud-Grimaud^{*}, S. Battu^{*#}, B. Liagre⁺, D. Y. Léger⁺, J. L. Beneytout⁺ and P. J. P. Cardot^{*}.

J. Chromatogr. A, 2006. 1128 (2006) 194-202.

*: Laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie, EA 3842, "Homéostasie Cellulaire et Pathologies", Université de Limoges, Faculté de Pharmacie, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges Cedex, France.

+ : Laboratoire de Biochimie, EA 1085 "Biomolécules et Cibles Tumorales", Université de Limoges, Faculté de Pharmacie, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges Cedex, France.

Corresponding author:

Tel.: + 33-5-5543-5979. Fax: + 33-5-5543-5859. E-mail: battu@pharma.unilim.fr

Keywords : Diosgenin; Apoptosis; Osteosarcoma cell line; Cell sorting; Sedimentation Field Flow Fractionation.

1. Abstract.

Apoptosis is one of the most important phenomena in cell biology. Pre-apoptotic cells, defined as cells engaged in early stages of apoptosis, could be used as a cellular tool to study apoptosis pathways. The human 1547 osteosarcoma cell line and diosgenin (a plant steroid) association was selected as an *in vitro* cellular apoptosis model. In a previous study, using this model, we demonstrated that SdFFF monitored apoptosis induction as early as 6 hours after incubation. In this study, we investigated the capacity of Sedimentation Field Flow Fractionation (SdFFF) to sort an enriched population of pre-apoptotic cells from 1547 cells incubated for 6 hours with 40 μ M diosgenin. In that way, two different separation devices which differed especially in channel thickness, 125 μ m and 175 μ m, were used and compared. Results showed, for the first time, that SdFFF is an effective method to obtain an enriched pre-apoptotic sub-population. These results suggest, as a new application, that SdFFF could be an included tool in the study of apoptotic mechanisms or the kinetic action of apoptotic drugs.

B. Discussion / Conclusion.

La comparaison des deux systèmes utilisant, contenant des canaux de 125 μm et 175 μm d'épaisseur, montre que l'un et l'autre des dispositifs, œuvrant à vitesse linéaire constante (≈ 40 cm/min), permettent l'élution en mode « Hyperlayer » des cellules 1547 témoins et traitées [3, 11, 14, 16-18, 20, 130, 213, 313, 314]. Ceci est démontré par la dépendance du facteur de rétention R_{obs} à la variation du champ (Tableau RIII-I), par la focalisation des cellules dans des lignes de vitesses situées au-dessus de la paroi d'accumulation ($s > r$, Tableau RIII-II) et par une capture cellulaire modérée (RP, Figs. RIII-3 et -4). Cependant, cette étude fait apparaître des utilisations et des applications différentes pour ces deux dispositifs.

Le canal de 125 μm permet, avec un temps d'analyse très court, le monitoring de l'induction apoptotique. Le pic d'élution est fin et présente une forte intensité à son maximum pour une quantité de cellules injectées moindre en comparaison du canal de 175 μm . Ceci représente un avantage majeur en terme de diagnostic : rapidité, faible quantité d'échantillon et dilution limitée. Cependant, comme l'indique la comparaison des valeurs expérimentales du facteur de sélectivité $S_{\text{d}_{\text{obs}}}$ (Tableau RIII-III), ce canal ne semble pas prendre en compte la variation de densité liée à l'induction d'apoptose, aussi clairement que le canal de 175 μm . Ceci se traduit par une séparation dépendante de la taille qui ne permet pas, après caractérisation des populations isolées, un tri efficace des cellules pré-apoptotiques. Aucune différence morphologique (figures apoptotiques / Fig. RIII-3) et de viabilité cellulaire (MTT / Fig. RIII-5), sont observées.

Le canal de 175 μm permet au contraire une meilleure prise en charge des variations de densité (tableau RIII-III). Ce dispositif favorise un élargissement des pics d'élution, un accroissement des temps et des facteurs de rétention, impliquant l'utilisation d'une quantité importante d'échantillon. Ce canal semble dès lors moins adapté pour le monitoring. Cependant il permet une séparation nette des différentes sous-populations. Si les cellules éluées en F2 semblent peu différentes de la population témoin, celles isolées en F3 présentent une morphologie caractéristique de cellules sensibles aux effets de la diosgénine (Fig. RIII-4) : cellules étalées présentant des extensions cytoplasmiques. Leur viabilité est altérée (Fig. RIII-5), mais l'analyse spécifique de l'apoptose ne montre pas d'accroissement spécifique de celle-ci (Fig. RIII-6). Cette population pourrait être constituée de cellules initialement en fin de cycle mitotique, et bloquées en phase G0/G1 par la diosgénine. Mais, du fait de l'absence de diosgénine, à la suite des processus de tri et de lavage, elles n'entreraient pas en apoptose. Il serait très intéressant de préciser le mode

d'action de la diosgénine en corrélation avec la progression dans le cycle cellulaire. Faut-il que la cellule soit dans une phase particulière du cycle pour que l'induction de l'apoptose soit effective?

Les cellules éluées en F1 montrent, quant-à elles, des figures nettes et caractéristiques de cellules en apoptose (Fig. RIII-4) : cellules flottantes au cytoplasme condensé. Ceci est confirmé par le test de viabilité cellulaire (Fig. RIII-5) et surtout par le test ELISA spécifique du phénomène apoptotique (Fig. RIII-6). Il montre un enrichissement important de cellules apoptotiques dans cette fraction, après 72 h de remise en culture.

La comparaison de ces résultats à ceux obtenus pour les fractions totales, ou avec le canal de 125 μm (Figs. RIII-5 et -6), montre que le processus d'éluion respecte l'intégrité, la spécificité et les états de différenciation cellulaires. Ainsi, pour la première fois, nous avons démontré la capacité de la SdFFF à isoler, de façon précoce, des cellules apoptotiques, excellent modèle d'étude du mécanisme et de la cinétique apoptotiques. Il semble également que l'enrichissement de telles populations puisse améliorer la sensibilité des tests de caractérisation du phénomène apoptotique (Fig. RIII-6).

L'association tri par SdFFF et processus de lavage (Fig. 27) à permis d'envisager de nombreuses applications pour la compréhension de mécanismes et de cinétiques complexes d'apoptose ou de différenciation [221].

De nouvelles applications dans le domaine de l'oncologie sont également envisagées telles que l'analyse de l'écologie (relation phénotypique) au sein de lignées ou la compréhension des cinétiques complexes de différenciation spontanée dans ces populations cancéreuses.

III. ETUDE DE LA LIGNÉE NEUROBLASTIQUE IMR-

32.

L'isolement de sous-populations d'intérêt [32] a servi de tremplin à l'utilisation de la SdFFF pour l'étude de l'écologie de populations cellulaires complexes telles que les lignées humaines de neuroblastome. Le modèle d'étude, 1547 et apoptose induite par la diosgénine, a montré que la SdFFF pouvait trier une sous-population d'intérêt : les cellules pré-apoptotiques. Ici, notre objectif est d'isoler différents phénotypes cellulaires, naturellement présents dans la lignée IMR-32.

Ces tumeurs représentent l'un des cancers solides les plus répandus chez l'enfant et proviennent d'un arrêt anormal de la différenciation des cellules embryonnaires dérivant des crêtes neurales [416]. Les chimiothérapies mises en place dans le traitement du neuroblastome incluent des drogues classiquement utilisées en thérapie anti-cancéreuse et qui conduisent à l'apoptose [149, 179, 180]. Mais l'échappement thérapeutique est tel que de nouvelles stratégies ont été envisagées impliquant notamment des thérapies de différenciation [149, 180]. Les tumeurs neuroblastiques, et les lignées qui en dérivent, sont constituées de différents phénotypes cellulaires correspondant à des stades de différenciation variables [416]. Au sein de ces lignées, 2 types cellulaires principaux sont décrits : des cellules adhérentes, différenciées dites « fibroblastoïdes » ou type-S (S pour stromal) et des cellules neuroblastoïdes, de type-N organisées en amas, ayant des caractéristiques de cellules immatures. Nous savons que les cellules neuroblastiques ont la capacité de se différencier spontanément *in vitro* et *in vivo*. Comprendre les mécanismes de différenciation, leur cinétique et les relations qui existent entre ces différents phénotypes permettrait de trouver des stratégies thérapeutiques adaptées et efficaces, car trop d'enfants atteints de neuroblastome meurent encore de nos jours.

La notion de différenciation s'inscrit dans la théorie des cellules souches cancéreuses puisque la différenciation a pour but de forcer ces cellules à entrer dans un cycle cellulaire normal, conduisant à une mort naturelle. Cette induction de l'apoptose aura comme effet de diminuer la taille de la tumeur et de prévenir la résurgence de nouvelle tumeur, métastases. En effet, ces cellules pourraient résister aux traitements et être responsables de l'échappement thérapeutique, puisque même une faible quantité de ces cellules peut reformer une masse tumorale [198, 200, 201, 203].

Notre étude a porté sur la lignée humaine de neuroblastome, IMR-32 qui, en culture, contient majoritairement des cellules de type-N et quelques cellules de type-S. Une analyse par cytométrie en flux de cette lignée a révélé que ces deux phénotypes ont des distributions

granulométriques et de tailles similaires. Ainsi, malgré une nette différence morphologique de ces cellules en culture (Fig RIV-1), celles-ci ne peuvent être triées par le cytométrie en flux.

Ces cellules ont donc été analysées par SdFFF dans le but d'étudier l'écologie de cette population cellulaire complexe. Des études préalables, menées au sein du laboratoire [52], sur une lignée neuroblastique moins hétérogène, SHSY-5Y, ont montré que la SdFFF permet de trier ces cellules en fonction de leur état de différenciation. Une fraction était enrichie en cellules Fas+ impliquant un caractère d'immatunité neurale, alors qu'une autre contenait une majorité de cellules adhérentes, N-CAM+, plus différenciées. Ces résultats ayant démontré la faisabilité de notre étude, notre objectif était de séparer les phénotypes, notamment les cellules immatures de type-N. Ce phénotype pourrait servir de modèle d'étude des mécanismes de différenciation spontanée, et de leur cinétique. La compréhension de tous ces mécanismes ayant comme objectif la recherche de stratégies thérapeutiques innovantes et efficaces.

Les paramètres d'élution mettant en œuvre le mode « Hyperlayer » ont été déterminés pour la lignée IMR-32. Trois fractions cellulaires ont été collectées et étudiées. Nos résultats ont montré que le mode « Hyperlayer » ne permettait pas, dans cette lignée, de séparer les cellules S- des cellules Type-N. Cependant, de façon surprenante et innovante, ce mode d'élution nous a permis d'isoler deux phénotypes de cellules de type-N et de comprendre la cinétique de différenciation entre amas neuroblatoïdes et cellules de type-S adhérentes. L'isolement de ces deux phénotypes nous est apparu fort intéressant et jamais encore décrit et a donné lieu à une deuxième étude qui a consisté à étudier leur comportement spécifique sous l'action d'agents apoptotiques (Fas ligand, 7C11, diosgénine) et différenciants (diosgénine, rosiglitazone, acide rétinoïque).

A. Study of the phenotypic relationship in the IMR-32 human neuroblastoma cell line by Sedimentation Field Flow Fractionation.

G. Bégaud-Grimaud¹, S. Battu^{1*}, P. Lazcoz³, J.S. Castresana³, M.O. Jauberteau² and P. J. P. Cardot¹.

Int. J. Oncol. (2007) in press.

¹: Laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie, E.A. 3842, "Homéostasie Cellulaire et Pathologies", Université de Limoges, Faculté de Pharmacie, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges Cedex, France.

²: Laboratoire d'Immunologie, E.A. 3842, "Homéostasie Cellulaire et Pathologies", Université de Limoges, Faculté de Médecine, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges Cedex, France.

³: Molecular Neuro-Oncology Laboratory, Facultad de Medicina, University of Navarra, Pamplona, Spain.

*Corresponding author: Tel.: + 33-5-5543-5979. Fax: + 33-5-5543-5858. E-mail: serge.battu@unilim.fr

Keywords: Neuroblastoma cell line; Cellular phenotype, Cell sorting; Sedimentation field flow fractionation.

Abbreviated running title: Study of the IMR-32 neuroblastoma phenotype by SdFFF.

1. Abstract.

Neuroblastoma (NB) is the most common childhood solid tumor. Although spontaneous regression can occur in patients less than 1-year old, 70 % of patients over the age of 1 year have a high-risk and difficult-to-treat NB. Cell type heterogeneity is observed either in the morphological appearance of NB tumors or in cell lines isolated from tumor specimens. NB consists of two principal neoplastic cells: 1) neuroblastic or N-type (undifferentiated cells); and 2) stromal or S-type (differentiated cells). As NB cells seem to have the capacity to differentiate spontaneously *in vivo* and *in vitro*, their heterogeneity could affect treatment outcome, in particular the response to apoptosis induced by chemotherapy. Therefore, it is important to understand the underlying process governing changes in differentiation in order to improve treatment response and NB patient outcome and the neoplastic population in IMR-32 represented a good model for that study. Results

showed that this cell line was extremely heterogeneous and highly variable in its stage of differentiation and we demonstrated that Sedimentation Field Flow Fractionation (SdFFF) permitted the isolation of 2 N-phenotypes and contributed to the understanding of the IMR-32 cell population dynamics. The first N-phenotype forms a pool of quiescent undifferentiated cells while the second one was able to proliferate (incorporation of BrdU) and also give rise to adherent S-type cells (PSA-N-CAM⁺ and N-CAM⁺). Results could also suggest a close interaction between these different cellular phenotypes to create the IMR-32 cell lineage.

B. Etude de l'apoptose et de la différenciation sur les phénotypes cellulaires triés par SdFFF à partir de la lignée IMR-32.

Les études précédentes menées sur la lignée neuroblastique IMR-32 ont montré que grâce au mode « Hyperlayer », la SdFFF a permis d'isoler deux phénotypes cellulaires différents jamais décrits [222]. La fraction isolée en F3 semblait être très intéressante puisque composée de cellules potentiellement tumorigènes et malignes (prolifératives et exprimant des marqueurs d'immaturité).

La fraction F1, quant à elle, semble être composée de cellules quiescentes, qui pourraient être, en partie, des cellules souches cancéreuses. Ces phénotypes sont donc de très bons modèles pour l'étude des effets d'agents apoptotiques ou inducteurs de différenciation dans un but de recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques. Enfin, la fraction F2 se comporte comme la population IMR-32 et sert de témoins.

1. Tri des IMR-32 par SdFFF.

Les conditions optimales d'élution (Fig. RIV-3, mode « Hyperlayer ») ont été préalablement définies [222] pour cette lignée cellulaire et les fractions collectées en routine sont : PT – Pic Total – et PF – Pic Fractions, PF1, PF2 et PF3 (Fig. RV-1).

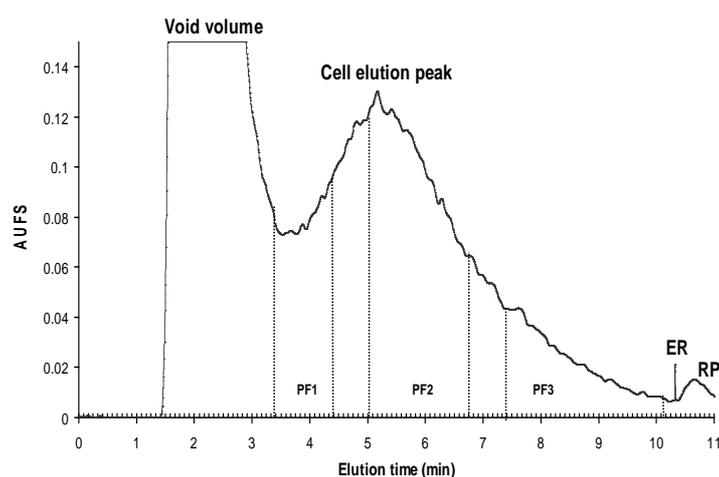


Figure RV-1 : fractogramme obtenu avec les IMR-32 : 4 fractions sont collectées, PT (3'20" à 10'05") et - F1 (3'20" à 4'25") - F2 (5'00" à 6'45") et F3 (7'20" à 10'05"). Les conditions d'élution sont décrites dans la figure RIV-3.

Pour obtenir la quantité de cellules nécessaire à la remise en culture, aux études d'immunofluorescence indirecte, d'induction d'apoptose et de différenciation...8 à 10 collections de fractions ont été réalisées.

2. Etude de l'effet apoptique de Fas Ligand par la méthode TUNEL.

Les premières investigations menées sur ces fractions cellulaires étaient l'étude des processus apoptotiques. En effet, un dysfonctionnement dans les voies de signalisation apoptotiques conduit à la formation des tumeurs et à leur progression [37, 149]. Elle est impliquée dans leur résistance au traitement, ce qui est notamment le cas pour les neuroblastomes. Nous savons que le système Fas/Fas L joue en rôle capital dans la régulation du cycle cellulaire et dans l'apoptose [113, 432, 433]. Cependant, un déficit en caspase-8, acteur majeur de la voie apoptotique activée par l'interaction Fas/Fas L, a été rapporté dans certaines lignées neuroblastiques [421]. Ainsi, même si les cellules IMR-32 expriment le récepteur Fas, la fixation de Fas L sur son récepteur ne semble pas avoir pas d'effet apoptotique sur ces cellules [222, 434]. Cependant l'expression du récepteur variant d'une fraction à l'autre (Fig. RIV-V), il semblait intéressant d'étudier les effets de ce ligand, notamment sur PF1 et PF3.

Après avoir remis les fractions en culture pendant 72 h (Fig. RV-2A), l'expression du récepteur Fas a été étudié par immunocytofluorescence indirecte (Fig. RV-2B).

L'induction de l'apoptose par Fas L a été étudiée à 2 concentrations différentes, 20 et 50 ng/mL, après 24 et 48 h d'induction. L'apoptose induite a été mesurée par la méthode TUNEL sur chacune des fractions étudiées (Fig. RV-2, C et D).

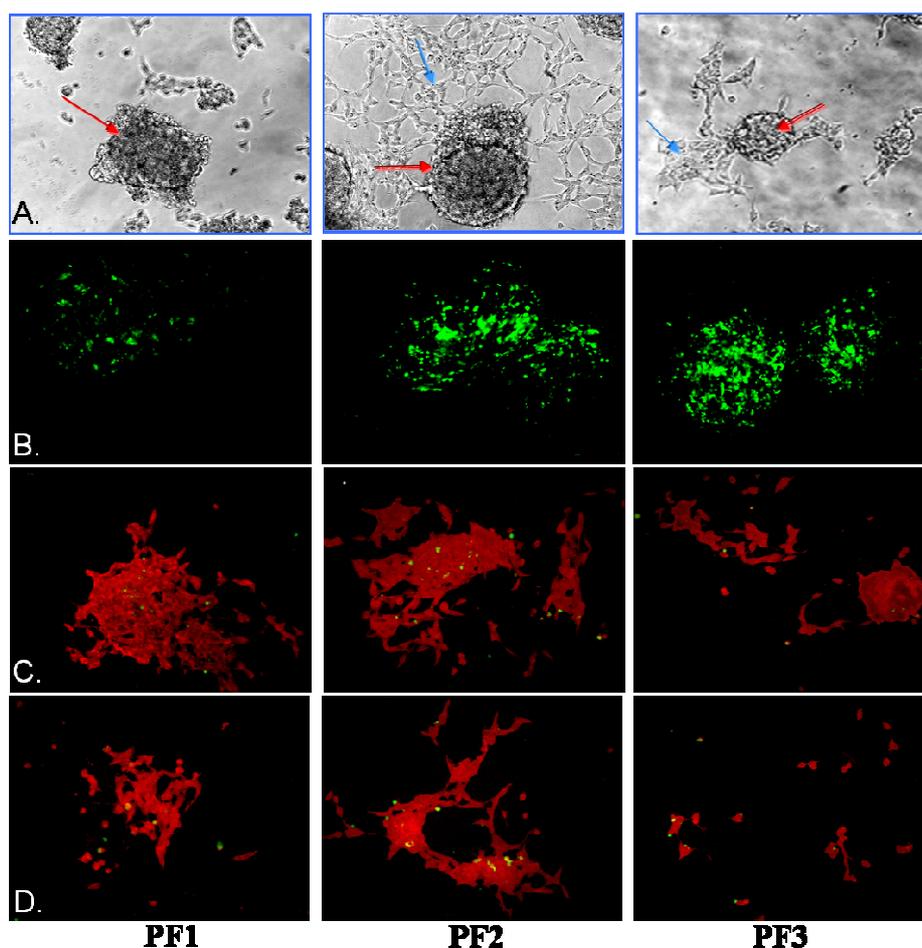


Figure RV-2 : étude de l'effet apoptotique de Fas L sur les sous-populations triées par SdFFF, par la méthode TUNEL. A : observation microscopique ; B : expression du récepteur Fas ; C et D : visualisation de l'apoptose par la méthode TUNEL de l'apoptose induite par Fas L à 20 ng/mL (C) et 50 ng/mL (D) pendant 48 h

Nous avons vu que le récepteur Fas était exprimé de façon croissante de PF1 à PF3 et ce uniquement dans les cellules neuroblastoïdes organisées en amas (Fig. RV-2B). Le TUNEL est une technique de détection des nucléosomes formés tardivement au cours de l'apoptose. Les cellules apoptotiques fluorescent en vert et un contre-marquage au Bleu Evans permet la visualisation des autres cellules. L'observation des fractions par microscopie à fluorescence semble montrer que Fas L n'a aucun effet apoptotique sur ces cellules, même après 48 h, et ce quelque soit la fraction et la concentration étudiée (Fig. RV-2C, -2D).

Nous avons émis l'hypothèse que Fas L pouvait avoir un effet un effet prolifératif sur les fractions comme cela a été décrit pour d'autres lignées cellulaires [68, 69]. Cependant, même si ces voies de signalisation restent à définir, il semble que ces effets impliquent également la caspase 8.

Une observation des fractions par microscopie visible à contraste de phase ne semblait pas non plus indiquer un effet prolifératif ou différenciant du Fas L.

Ces études ont montré que, mêmes isolés, ces phénotypes ne répondent pas aux effets apoptotiques ou prolifératifs de Fas L, ce qui laisse supposer qu'aucun d'entre eux ne contient de caspase-8.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons testé un anticorps agoniste du récepteur Fas, ayant un effet apoptotique reconnu, le 7C11 [435].

3. Etude de l'effet apoptotique du 7C11 par la méthode Annexine V/IP en cytométrie en flux.

Les IMR-32 ont étéensemencées (48 h) puis incubées avec un anticorps agoniste du récepteur Fas, le 7C11, à 50 et 100 ng/mL (48 h). L'effet apoptotique de cet agoniste a été évalué par cytométrie en flux. Cette technique est basée sur la détection d'un mécanisme précoce de l'apoptose : l'externalisation des phosphatidylsérines membranaires. Les cellules qui sont apoptotiques fixe l'annexine V couplé au FITC et fluorescent en vert. Le ratio apoptotique est calculé en faisant le rapport entre les pourcentages de cellules traitées et témoins ayant fixé l'annexine V. L'IP permet de distinguer l'apoptose de la nécrose, puisqu'il ne pénètre que si les cellules sont perméabilisées, c'est-à-dire celles mortes par nécrose et non par apoptose.

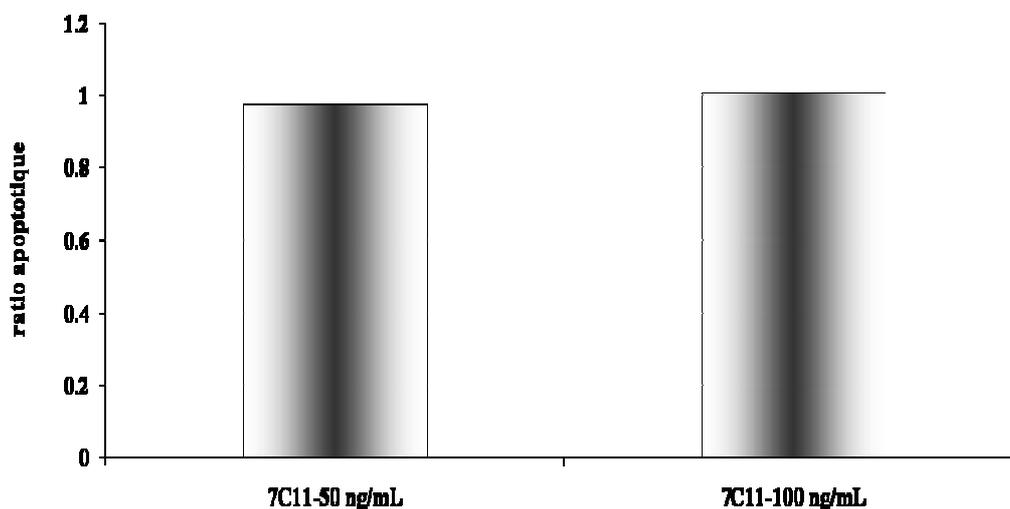


Figure RV-3 : évaluation de l'apoptose induite sur les cellules IMR-32 par le 7C11 par étude de l'annexine V/IP en cytométrie en flux.

Les cellules ne sont pas sensibles aux effets pro-apoptotiques du 7C11, même à une concentration de 100 ng/mL (Fig RV-3). Une observation microscopique de ces cellules ne semblait pas montrer non plus, d'effet prolifératif du 7C11 confirmant les résultats obtenus avec Fas L.

4. Observations microscopiques des effets induits par la diosgénine.

Nous avons alors testé un autre agent apoptotique, la diosgénine dont on sait qu'elle induit l'apoptose dans certaines lignées cancéreuses : ostéosarcome humain, lignée 1547 [32, 131], erythroleucémie humaine, lignée HEL [213]... Cette drogue apparaissait intéressante à étudier puisqu'elle fait appel à une voie de signalisation différente de celles des récepteurs de mort. La diosgénine est un stéroïde et va se fixer sur des récepteurs aux estrogènes [142]. La fixation du ligand sur le récepteur entraîne une internalisation du complexe récepteur/ligand qui va transiter dans la cellule et agir dans le noyau. Même si les voies de signalisation de la diosgénine n'ont pas été totalement élucidées, il a été montré que l'activité des caspases-8 et -9 n'est pas significativement augmentée par l'action de la diosgénine [131].

Après tri par SdFFF, les fractions sont remises en culture pendant 48 h. Ce temps de remise en culture est nécessaire à la visualisation des différents phénotypes qui composent les fractions : amas denses et volumineux de cellules de type-N en PF1, mélange de cellules de types -N et -S en PF2 comparable à la population totale, et petits amas de type-N et quelques cellules de type-S en PF3.

Ces fractions ont ensuite été incubées avec la diosgénine à 40 μ M pendant 24 h. A cette concentration, la diosgénine a déjà démontré ses effets apoptotiques sur d'autres lignées cellulaires et, comme nous l'avons vu précédemment, sur la lignée d'ostéosarcome 1547 [32, 129, 147, 213, 412]

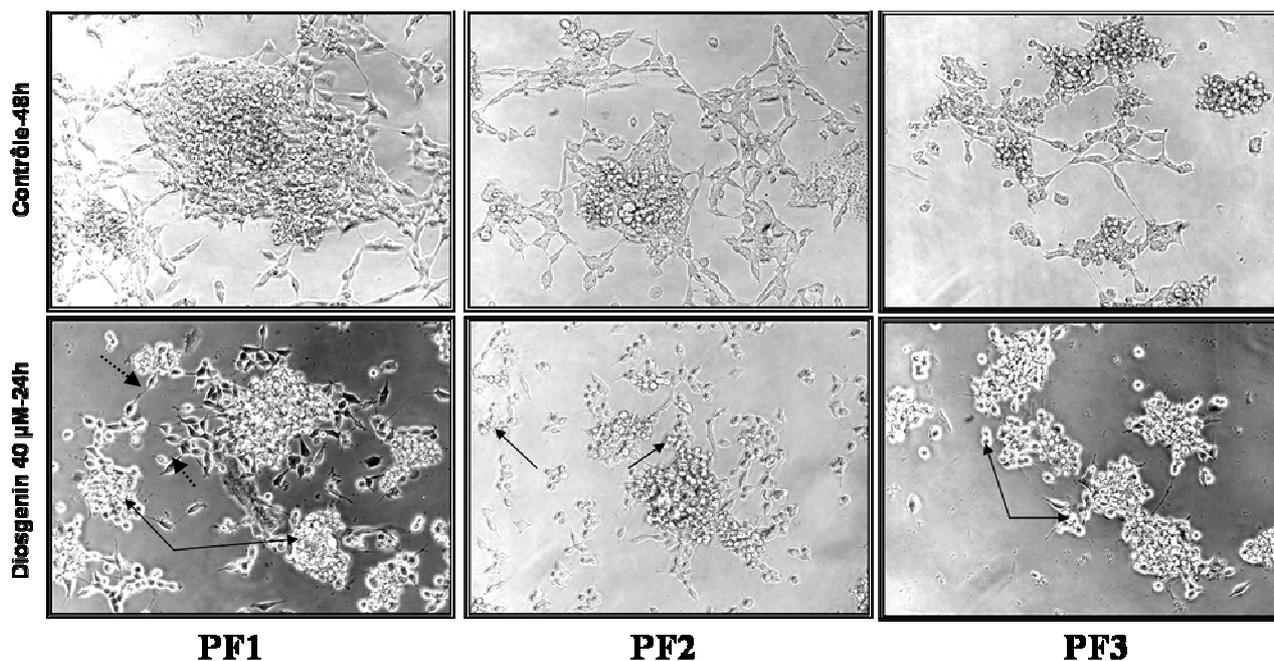


Figure RV-4 : observations microscopiques des effets de la diosgénine à 40µM après 24 h de traitement sur les fractions.

Sous l'effet de la diosgénine, les cellules adhérentes deviennent apoptotiques (flèches pleines Fig. RV-4). Ce résultat était particulièrement frappant dans les fractions PF2 et PF3 dans lesquelles toutes les cellules de type-S sont devenues apoptotiques. En PF1, nous avons pu constater que les cellules neuroblastoïdes semblaient moins touchées par la diosgénine même si certaines cellules présentent une morphologie caractéristique [32], avec des expansions cytoplasmiques (Fig. RV-4, flèches en pointillé), laissant présager une sensibilité de ces cellules à la diosgénine. Les amas neuroblastoïdes contenus dans cette fraction perduraient et restaient volumineux.

Pour la première fois, nous avons montré que la diosgénine était capable d'induire l'apoptose sur les cellules IMR-32. Grâce à l'isolement des phénotypes de type-N, nous avons pu constater que cette apoptose était d'autant plus efficace que les cellules étaient différenciées. Or, nous savons que les tumeurs neuroblastiques résultent, en grande partie, d'un déficit de différenciation des cellules sympathiques dérivant de la crête neurale, et que la plupart des thérapies anti-cancéreuses visent à tuer les cellules par agents apoptotiques [434, 436-438]. Ainsi, il est facile de comprendre que les cellules qui résistent et échappent aux traitements sont les cellules indifférenciées.

Nous avons alors envisager une stratégie thérapeutique associant aux effets apoptotiques de la diosgénine sur les cellules de type-S, une molécule capable de différencier les cellules de type-N.

4.1. Etude comparative des effets différenciants de la diosgénine et de la rosiglitazone.

Nous avons tout d'abord testé l'acide rétinoïque dont les effets différenciants ont été montré sur certaines lignées de neuroblastome, [183, 190, 439, 440]. Sur les cellules IMR-32, l'acide rétinoïque semble avoir un effet toxique. En effet, même à très faible concentration, 0,5 μM , l'acide rétinoïque entraînait une altération massive des cellules. Nous avons alors testé les effets différenciants de la diosgénine [31, 213, 221, 413, 441] et d'un agoniste des récepteurs PPAR- γ , la rosiglitazone [442, 443].

Ces 2 effecteurs ont été testés sur la population totale IMR-32. D'après les données bibliographiques, la diosgénine à 10 μM a un effet différenciant reconnu sur certaines lignées cancéreuses et notamment les cellules érythroleucémiques humaines [31, 213, 221, 413, 441], dans lesquelles elle induit une différenciation mégacaryocytaire. Nous avons testé également les concentrations 5 et 20 μM : la première n'a aucun effet visible et la seconde semble induire un léger effet apoptotique en plus de celui de différenciation.

Une gamme de concentrations, allant de 5 à 40 μM , a été testée pour la rosiglitazone (résultats non montrés). Des études, menées au sein du laboratoire sur la lignée glioblastiques U-87 MG, ont montré un effet différenciant croissant de la rosiglitazone jusqu'à un plateau pour la concentration de 20 μM . Des résultats similaires ont été observés sur la lignée IMR-32 et nous avons retenu la concentration 20 μM pour la suite de notre étude.

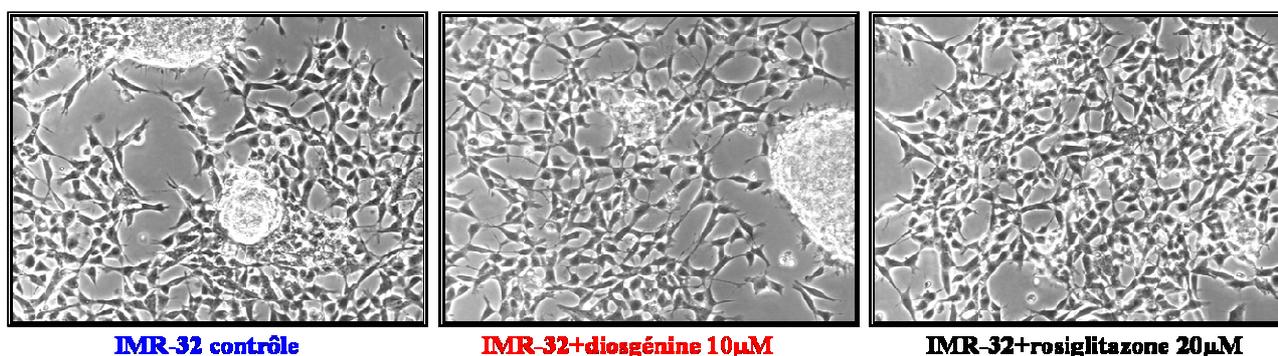


Figure RV-5 : observations morphologiques par microscopie optique à contraste de phase des cellules traitées à la diosgénine (10 μM) et à la rosiglitazone (20 μM) pendant 72h.

Nous avons observé que la diosgénine ne semblait pas avoir d'effet différenciant. Le tapis de cellules adhérentes était semblable à la population témoin et les amas neuroblastoïdes perduraient (Fig. RV-V).

En revanche, sous l'effet de la rosiglitazone, le nombre de cellules adhérentes s'accroît et les amas sont nettement moins volumineux (Fig. RV-5). La rosiglitazone à 20 μ M semble entraîner la différenciation des cellules neuroblastoïdes en cellules fibroblastiques. Afin de quantifier cette différenciation, l'expression d'un marqueur de maturité des cellules neuronale, la N-CAM a été étudiée par cytométrie en flux. Les résultats obtenus n'ont pas donné de différences significatives entre cellules témoins et cellules traitées par la rosiglitazone à 20 μ M. Nous avons émis l'hypothèse que l'anticorps utilisé pour ce marquage n'était pas suffisamment spécifique en reconnaissant également la forme polysialylée de la N-CAM, la PSA-N-CAM. Cette dernière est spécifique des processus de migration neuronale et marque les cellules en phase de différenciation. Nous avons vu précédemment [222] que les cellules témoins exprimaient ce marqueur à la périphérie des amas. Comme la rosiglitazone semble induire la différenciation, la quantité de cellules exprimant la PSA-N-CAM doit augmenter sensiblement et il n'est pas possible de quantifier réellement le nombre de cellules différenciées.

Puisque le marquage N-CAM par cytométrie en flux n'est pas un bon outil de quantification du processus de différenciation induit par la rosiglitazone dans ces cellules, le suivi de ce processus de différenciation a été réalisé par SdFFF. Compte tenu des résultats obtenus dans d'autres types cellulaires [31, 221], nous avons essayé de voir si la SdFFF pouvait être utilisée pour objectiver cette différenciation. Les fractogrammes obtenus avec les populations témoins et traitées par la diosgénine à 10 μ M et par la rosiglitazone à 20 μ M ont été comparés (Fig. RV-6).

IMR-32 : **contrôle** - **diosgénine à 10 μ M** - **rosiglitazone à 20 μ M**, 10 g, 0.8 mL/min

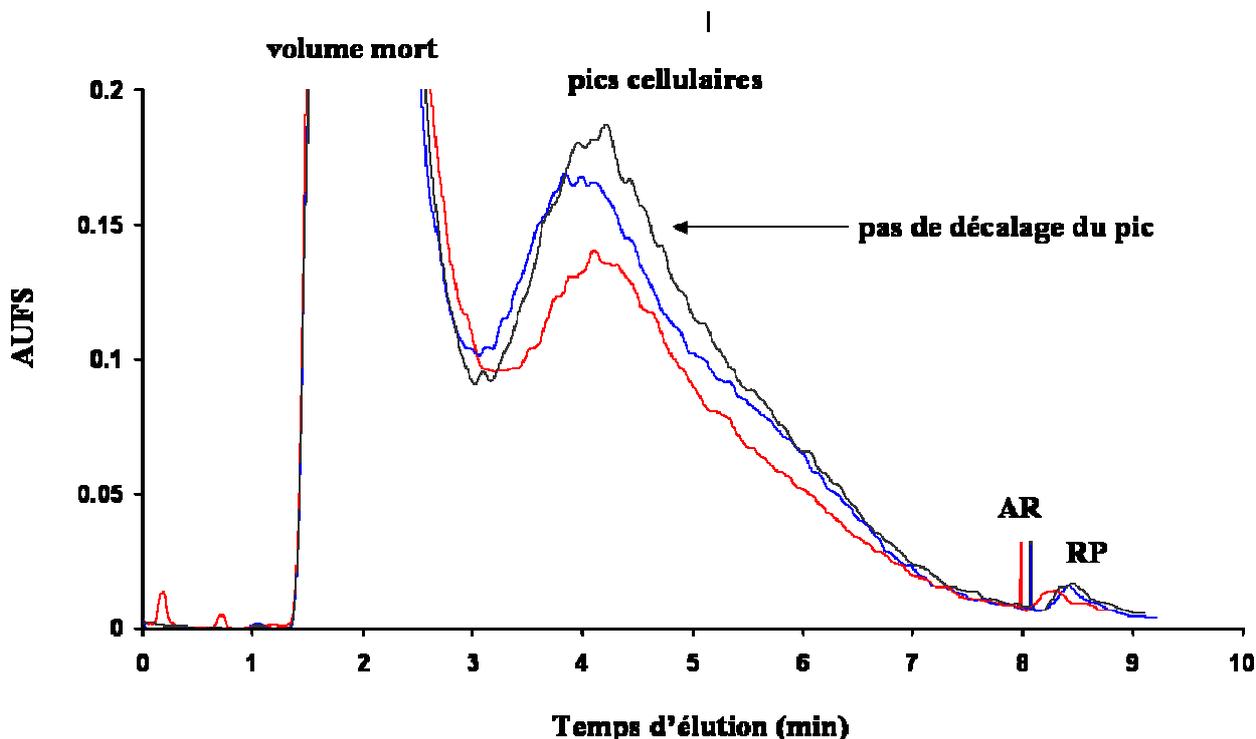


Figure RV-6 : fractogrammes obtenus lors de l'élution des populations IMR-32 témoins (bleu) et traitées par la diosgénine à 10 μ M (rouge) ou la rosiglitazone à 20 μ M (noir) pendant 72h. Les conditions d'élution sont identiques aux précédentes (Fig. RV-1).

Les profils d'élution obtenus ne montrent pas de différences significatives entre cellules traitées et cellules témoins. Ce résultat ne semble pas très surprenant parce que nous n'avons pas réussi à isoler les cellules de type-S et les cellules de type-N, co-élues dans PF2 [222]. Ainsi, même si la quantité de cellules de type-S augmente, ces cellules doivent rester éluées dans PF2 ce qui explique qu'il n'y ait pas de répercussion visible sur les fractogrammes (Fig. RV-6).

Nous savons isoler en PF1 et en PF3, des phénotypes type-N présentant des caractéristiques très différentes. Les cellules de type-N en PF1 sont en état de quiescence et expriment peu de marqueurs biologiques, alors que celles isolées en PF3 prolifèrent, expriment fortement les marqueurs d'immaturité et sont capables de se différencier spontanément. Il semblait donc intéressant de voir leur réponse spécifique à la rosiglitazone à 20 μ M puisque ce sont ces cellules qui doivent être différenciées. Nous avons également testé la diosgénine à 10 μ M mais comme sur la population totale, elle ne semble pas avoir d'effet sur les fractions (résultats non montrés).

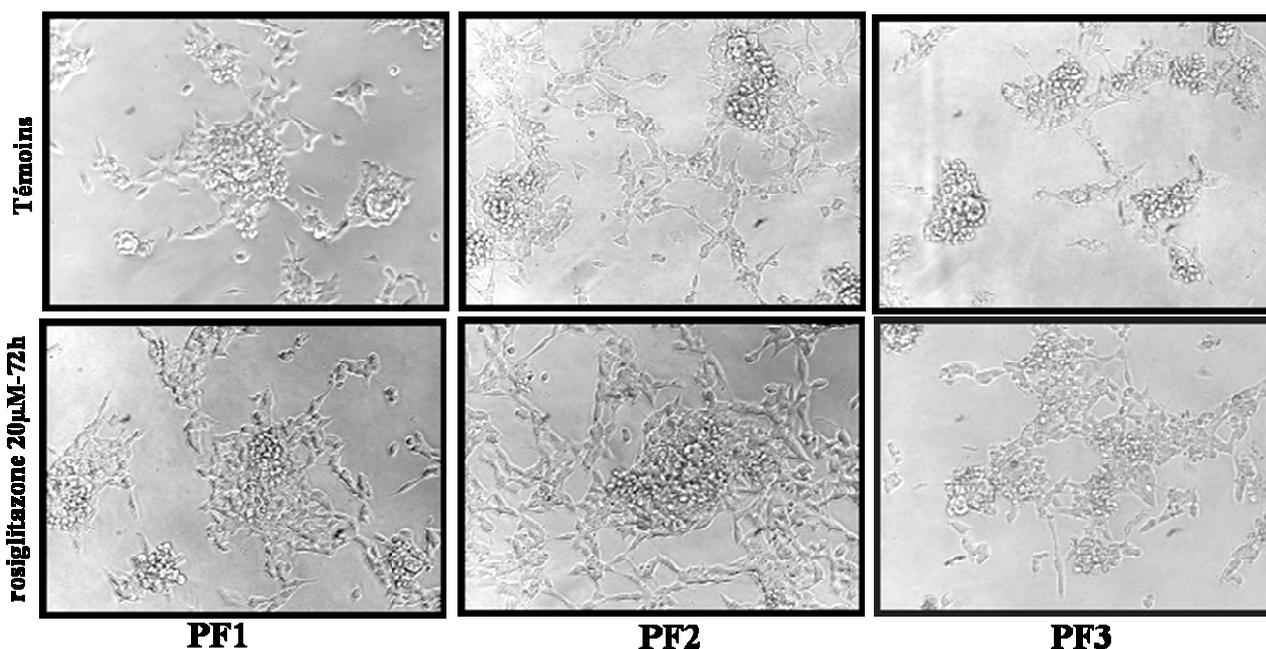


Figure RV-7 : étude de l'effet différenciant de la rosiglitazone sur les fractions.

L'observation microscopique des cellules montre que la rosiglitazone à 20 μM a un effet différenciant sur les fractions, notamment sur PF2 et PF3. Dans PF3, l'effet différenciant de la rosiglitazone se traduit par une diminution très importante de la taille des amas et une augmentation significative du nombre de cellules adhérentes. Dans PF2, en revanche, le tapis cellulaire devient plus dense mais il reste encore des amas. Enfin, ce sont les observations dans PF1 qui nous ont paru les plus intéressantes. En effet il semble que la rosiglitazone n'ait qu'un effet limité sur ces cellules que nous avons qualifiées de quiescentes dans notre étude précédente [222]. A la lumière de ces résultats nous avons émis l'hypothèse que ces cellules revêtent toutes les caractéristiques des cellules souches cancéreuses.

De plus, il serait fort intéressant de suivre les effets différenciant de la rosiglitazone sur les fractions par SdFFF, notamment PF2 et PF3. Le profil d'élution de ces fractions isolées seraient, dans un premier temps, analysées par SdFFF puis comparés à ceux obtenus lorsque ces fractions ont subi un traitement à la rosiglitazone.

Ainsi, PF1 et PF3 représentent d'excellents modèles d'étude pour tester les effets d'une stratégie thérapeutique associant, une drogue différenciante, la rosiglitazone et, une drogue apoptotique, la diosgénine sur la lignée IMR-32 (Fig. RV-8). Enfin, il conviendrait de suivre l'évolution de la différenciation, par SdFFF, au sein des fractions et non de la population totale, en comparant leur réponse aux agents différenciants. ceci permet l'objectivation de l'effet de

différenciation que l'on n'a pas réussi à faire sur la population totale par SdFFF avec le marquage N-CAM.

4.2. Résultats préliminaires des effets combinés de la rosiglitazone et de la diosgénine.

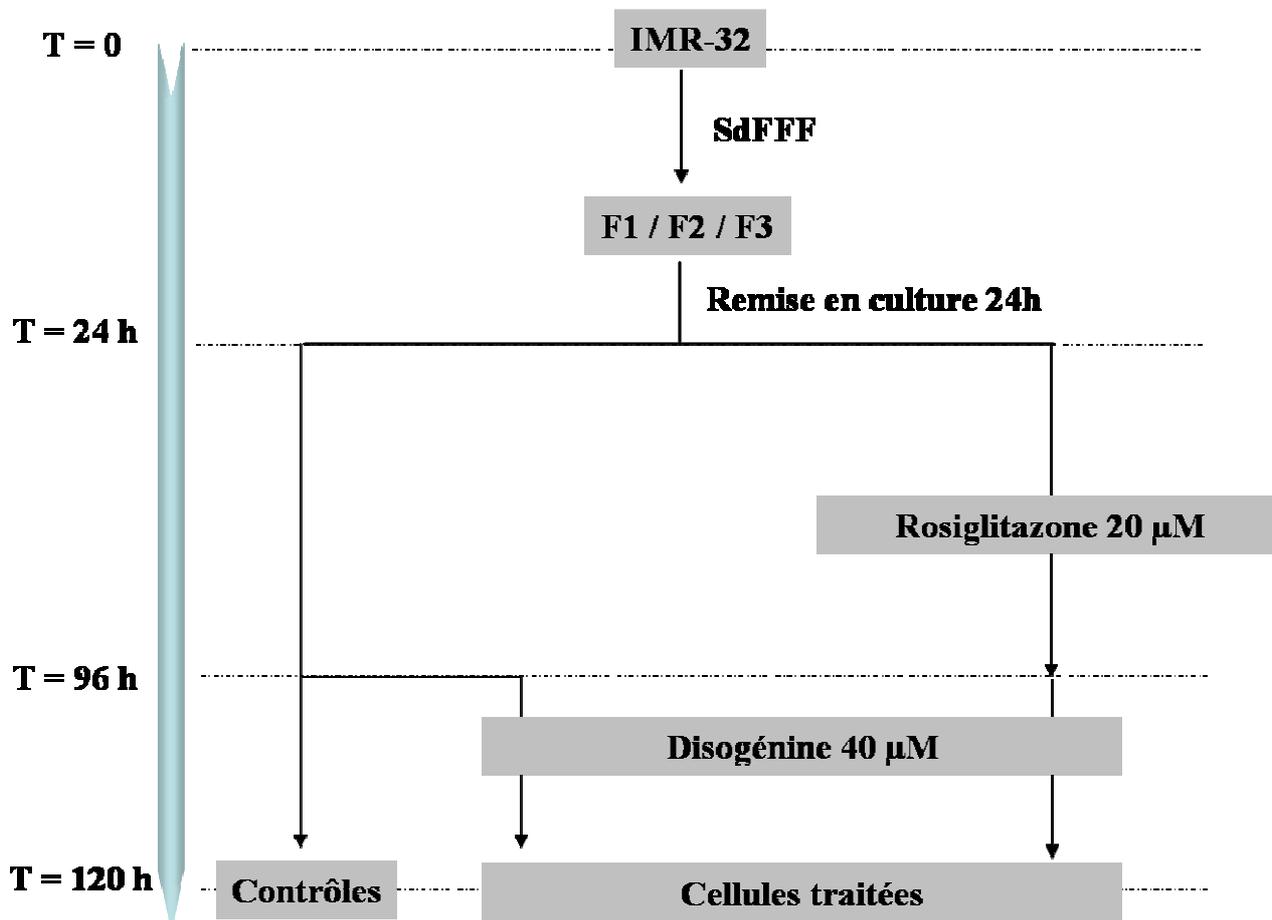


Figure RV-8 : schéma explicatif des traitements réalisés sur les fractions remises en culture.

Une observation microscopique de ces cellules a confirmé l'effet apoptotique et de la diosgénine à 40 µM sur les cellules différenciées (Fig. RV-9).

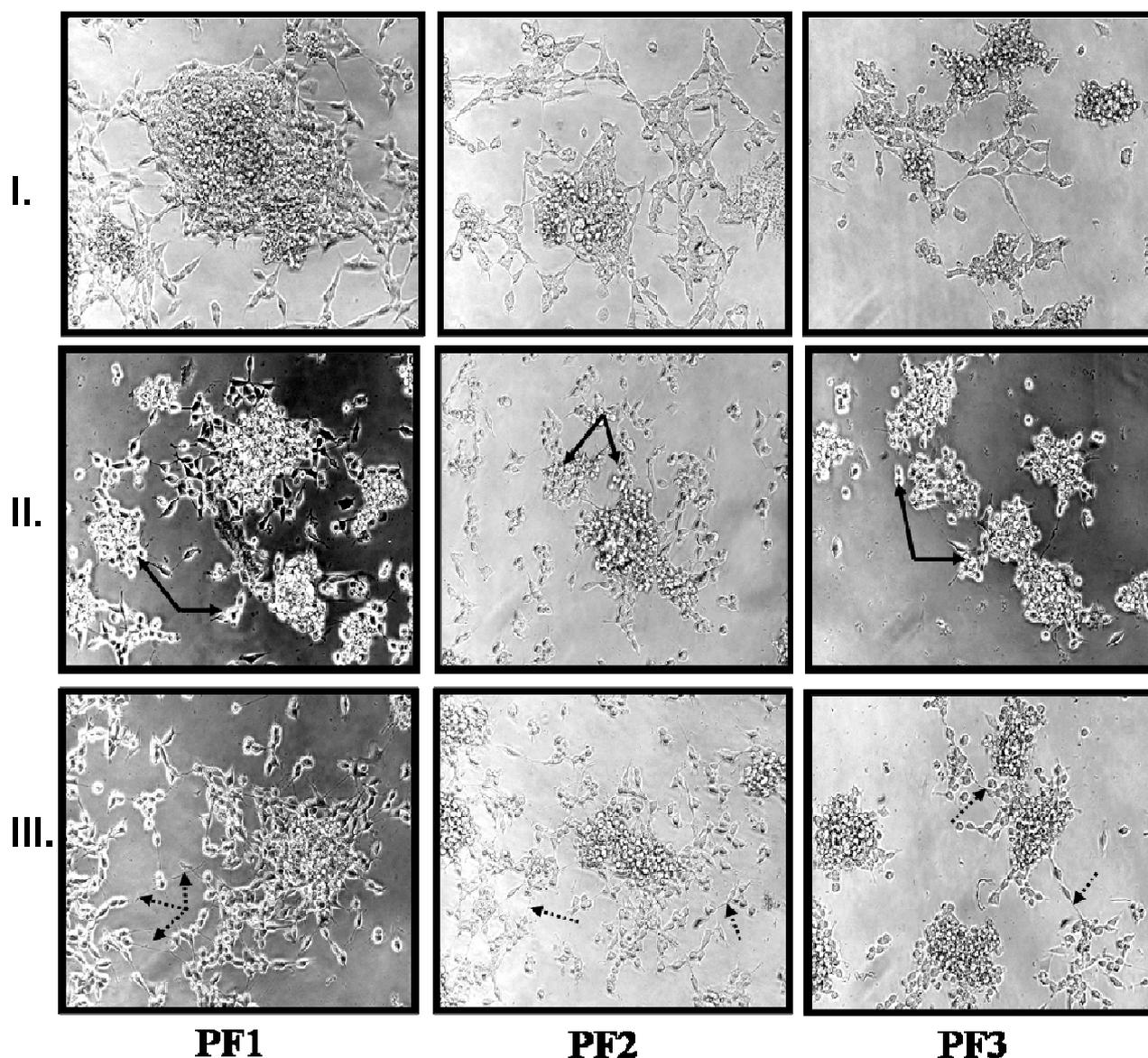


Figure RV-9 : observations microscopiques de l'effet associatif de la rosiglitazone et de la diosgénine sur les fractions. I : cellules témoin,, II : cellules traitées par la diosgénine à 40 μ M pendant 24 het III : cellules traitées par la rosiglitazone à 20 μ M pendant 72h puis par la diosgénine à 40 μ M pendant 24h.

L'observation microscopique de ces cellules a confirmé les effets apoptotiques de la diosgénine sur les cellules différenciées. Cet effet est notamment visible dans PF3 où la rosiglitazone a induit une augmentation significative du nombre de cellules de type-S. Dans cette fraction, la quasi-totalité des cellules différenciées sont mortes par apoptose après avoir été incubées avec la diosgénine (Fig. RV-9, III).

En PF2, l'association de la rosiglitazone avec la diosgénine a entraîné une diminution de la taille des amas plus importante qu'avec la diosgénine seule (Fig. RV-9, II et III). En revanche, il

reste dans cette fraction une quantité non négligeable de cellules adhérentes non apoptotiques mais présentant des modifications de leur cytoplasme caractéristiques des effets de la diosgénine. Ce type de cellules a déjà été décrit lors de l'apoptose des cellules 1547 et ont été isolées par SdFFF dans la fraction PF3 [32]. Ce résultat peut s'expliquer par un effet dose-dépendant, la quantité de cellules de type-S étant plus importantes, la diosgénine a besoin de plus de temps pour entraîner l'apoptose de toutes les cellules. De plus, dans cette fraction, les cellules sont à des stades de différenciation très différents.

Nous avons vu précédemment [222] que la population totale était composée de cellules neuroblastiques immatures (type-N) organisées en amas, qu'à la périphérie de ces amas certaines cellules vont amorcer leur différenciation (type-I) et vont donner des cellules totalement différenciées (type-S). Nous pouvons émettre l'hypothèse que, sous l'effet de la rosiglitazone, les cellules de type-I vont devenir des cellules différenciées de type-S et les cellules de type-N des cellules de type-I.

D'autre part, des études ont montré que sur des lignées érythroleucémiques (HEL, K562), la diosgénine ne pouvait exercer ses effets apoptotiques que lorsque les cellules sont bloquées dans une phase précise du cycle et qu'elle agit sur les cellules en les bloquant en phase G0/G1 [144]. Ainsi, dans notre modèle, la diosgénine a un effet apoptotique sur les cellules différenciées mais il se peut que le temps d'incubation (24 h) ne soit pas suffisant pour induire une apoptose des cellules en cours de différenciation. Nous pouvons supposer que le cycle de ces cellules est d'abord stoppé, (cellules modifiées, flèches en pointillé, Fig. RV-9), avant de pouvoir partir en apoptose. Nous pouvons supposer que le cycle cellulaire doit d'abord être bloqué en G0/G1 pour que la diosgénine induise, dans un second temps l'apoptose de ces populations cellulaires.

Enfin, concernant la fraction PF1, les résultats obtenus sont très intéressants puisqu'ils confirment l'hypothèse que ces cellules, quiescentes, exprimant faiblement les marqueurs biologiques neuroblastiques, pourraient être des cellules souches cancéreuses. Bien que ces cellules répondent aux effets de la bithérapie, rosiglitazone + diosgénine, ce qui se traduit par une diminution notable de la taille des amas neuroblastoïdes ; une quantité non négligeable de cellules organisées en amas, restent intactes (Fig. RV-9, IV).

C. Discussion / Conclusion.

L'utilisation de la SdFFF dans le domaine de la neuro-oncologie est maintenant clairement établie [52, 222]. Nos résultats ont montré que la SdFFF est une technique de tri efficace pour l'étude de l'écologie de populations complexes telles que des lignées cancéreuses neuroblastiques. La compréhension des mécanismes de différenciation et de la relation phénotypique existant au sein de la lignée complexe IMR-32 nous a conduits à envisager de nouvelles approches thérapeutiques.

Dans cette étude, la SdFFF est apparue comme un outil indispensable puisque les deux phénotypes, présents au sein de cette lignée (Fig. RIV-1), apparaissaient comme une population unique et ne pouvaient donc pas être triés par cytométrie en flux. La lignée humaine de neuroblastome IMR-32 a été analysée par SdFFF, une fois les conditions d'élution mettant en œuvre le mode « Hyperlayer », caractérisées et déterminées. Ce mode d'élution a permis de collecter des fractions cellulaires stériles, viables tout en respectant l'état de différenciation cellulaire. Cependant, et de façon surprenante, ce mode d'élution n'a pas permis de séparer les cellules de type-S- et -N comme cela avait été décrit pour la lignée SHSY-5Y [52].

En revanche, le tri par SdFFF a isolé deux phénotypes différents de cellules de type-N. Ces 2 phénotypes ont des caractéristiques morphologiques et biologiques très différentes. Le premier, isolé en PF1, est composé de cellules de type-N quiescentes exprimant faiblement les marqueurs spécifiques des cellules neuroblastiques (nestine et fas) et pourraient correspondre à des cellules souches cancéreuses. Le deuxième phénotype, isolé en PF3, contient des cellules prolifératives exprimant fortement les marqueurs d'immaturité neurales (nestine+, Fas+), mais également capables de se différencier en cellules de type-S. Ces cellules ont servi de modèle d'étude pour la compréhension des mécanismes de différenciation spontanée ainsi que leur cinétique. Après 24 h de remise en culture, des cellules rondes se détachent de la périphérie des amas neuroblastoïdes. Ces cellules expriment la PSA-N-CAM, marqueur de migration et de différenciation neuronales, et donnent après 48 h de remise en culture des cellules différenciées, adhérentes, de type-S. Ces cellules ayant des propriétés migratoires pourraient être impliquées dans la formation des métastases et avoir un rôle prépondérant dans la malignité de ces tumeurs. Elles pourraient correspondre à un phénotype intermédiaire à N et S, appelé type-I [222, 444].

Grâce à l'isolement par la SdFFF de ces 2 phénotypes différents de cellules de type-N, nous avons compris la cinétique de différenciation des cellules IMR-32 ainsi que la relation qui existe entre les cellules de type-S et -N. Les cellules neuroblastoïdes sont bien des cellules indifférenciées qui expriment des marqueurs d'immaturité neuronale et qui prolifèrent, ce qui leur

confèrent des propriétés tumorigènes. Certaines de ces cellules se différencient en passant par un phénotype intermédiaire, de type-I et donnent des cellules neuronales matures de type-S. En regard de ces résultats, l'apoptose de cellules, préalablement différenciées par un inducteur de différenciation, apparaît comme une stratégie thérapeutique pertinente. Nous savons que ces tumeurs mettent en place de nombreux processus pour échapper aux agents thérapeutiques [173, 176], l'oncogène *MDR* par exemple et par la formation de métastases (§ 2.4., p. 50). Il est donc nécessaire sur ces lignées cancéreuses de déterminer les drogues susceptibles de les différencier et de les faire entrer en apoptose. Nous avons alors réalisé 2 séries de tests.

Nos premières investigations ont porté sur l'étude de l'apoptose. Les résultats obtenus avec le Fas L et le 7C11 ont montré que le déficit en caspase-8, décrit pour la lignée, pourrait concerner tous les phénotypes cellulaires. Aucun effet apoptotique n'a pu être induit par ces agonistes du récepteur Fas, quelque soit la fraction, la concentration et le temps d'incubation. Les effets de la diosgénine, apoptotique sur d'autres lignées cellulaires (1547, HEL...), ont ensuite été étudiés. Il s'est avéré que la diosgénine ait un effet apoptotique sur les cellules IMR-32, notamment sur les cellules de type-S. Grâce au tri par SdFFF, nous avons vu en effet que les fractions 2 et 3 semblaient plus touchées que PF1 et, qu'après 24 h de traitement, la quasi-totalité des cellules adhérentes étaient apoptotiques.

Nos études se sont ensuite orientées vers la recherche de drogues induisant la différenciation. Nous avons alors testé les effets de l'acide rétinoïque, de la diosgénine et de la rosiglitazone. Seule la rosiglitazone à 20 μM avait un effet différenciant significatif notamment en PF3 et en PF2, la fraction PF1 là encore se comportant différemment.

Nous avons alors mis en place et tester la bithérapie, en incubant préalablement les cellules avec la rosiglitazone à 20 μM pour les différencier, puis avec la diosgénine 40 μM pour induire l'apoptose de ces cellules différenciées (Fig. RV-8, 9). Cette association a eu un effet variable en fonction des fractions. PF3 et PF2 contiennent des cellules de type-N qui répondent très bien aux effets différenciants de la rosiglitazone et à l'effet apoptotique de la diosgénine. Cependant, PF2 semble avoir besoin d'une incubation plus longue avec la diosgénine pour que toutes les cellules entrent en apoptose. Nous savons qu'en PF3, PSA-N-CAM est fortement exprimé à la périphérie des amas. Cela peut se traduire par le fait que ces cellules soient dans une dynamique de différenciation plus rapide que les cellules en PF2 et que la rosiglitazone conduise la majorité des cellules dans une phase du cycle les rendant sensibles aux effets apoptotiques de la diosgénine. En PF2, les cellules semblent plus hétérogènes dans leur état de différenciation ce qui implique que les cellules ne soient pas synchronisées par la rosiglitazone et qu'il faudrait un temps d'incubation avec

la diosgénine plus long, permettant à toutes les cellules de devenir sensibles aux effets de cet inducteur apoptotique.

La fraction PF1 est vraiment apparue comme un phénotype très particulier. Nos résultats ont renforcé notre hypothèse qui consistait à qualifier cette population de cellules souches cancéreuses. En effet, ces cellules neuroblastoïdes, isolées grâce à la SdFFF, prolifèrent peu et s'organisent en amas denses et volumineux qui perdurent en ne donnant que quelques cellules de type-S après plusieurs jours de remise en culture. Au niveau des amas, les cellules n'expriment que faiblement les marqueurs d'indifférenciation neurale, Fas et nestine. De plus, nos récents résultats, bien que préliminaires, indiquent que ces cellules réagissent différemment des autres fractions aux effets différenciant et apoptotique de la rosiglitazone et de la diosgénine. En fait, nous pouvons supposer que le recrutement de ces cellules par la rosiglitazone demande plus de temps pour que la différenciation soit efficace, ce qui permettrait d'accroître les effets apoptotiques de la diosgénine. La notion de cinétique semble être la clef de l'efficacité de cette bithérapie. Au regard de ces résultats, la bithérapie envisagée, bien que pouvant être optimisée, semble prometteuse. Cependant, le point crucial qui reste à éclaircir, concerne le phénotype-N isolé en PF1 qu'il conviendrait, en premier de caractériser, en utilisant des marqueurs spécifiques de cellules souches neurales tels que le CD133 [198]. Enfin, il faudrait adapter notre protocole de bithérapie ou tester d'autres molécules actives sur ces cellules.

Bien que préliminaires, nos résultats mettent en exergue l'énorme potentiel de la SdFFF pour l'étude de la compréhension des phénomènes complexes impliqués dans les pathologies neuro-oncologiques. Ceux-ci devront être complétés par des tests spécifiques de caractérisation de l'apoptose (ELISA, TUNEL, Annexine V/IP...) et de la différenciation. De plus, la théorie de cellules souches cancéreuses doit être largement étayée puisqu'elle pourrait être l'une des causes de résistance et d'échappement thérapeutiques de ce type de tumeurs. En effet, sans le tri de cette sous-population, nous n'aurions pas pu voir qu'une partie de la population IMR-32, n'est pas touchée par la bithérapie.



DISCUSSION GENERALE

Au cours de ces dix dernières années, les travaux menés au sein du Laboratoire de Chimie Analytique dirigé par Monsieur Le Professeur Cardot ont convergé vers l'adaptation instrumentale de la SdFFF au monde des biotechnologies et à ses applications dans de nombreux domaines incluant l'hématologie, la cancérologie, la biologie moléculaire et les neurosciences. Ces travaux de thèse ont donc contribué à cette évolution en orientant les applications de la SdFFF vers un domaine scientifique majeur et incontournable, la cancérologie. Plus récemment, lors de notre intégration dans l'Equipe d'Accueil 3842, homéostasie cellulaire et pathologies, dirigée par Madame Le Professeur Jauberteau-Marchan, nos études se sont tournées vers un axe de recherche complexe, celui de la neuro-oncologie [52, 222].

Le cancer reste l'un des fléaux majeurs de notre époque, malgré les innombrables travaux de recherche qui ont permis une meilleure connaissance des processus de cancérisation et la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ainsi, la SdFFF s'est intégrée dans le domaine de l'oncologie par l'étude de lignées cellulaires cancéreuses et des processus biologiques tels que la différenciation, l'apoptose, ou la compréhension de la dynamique cellulaire, ce qui rejoint la problématique des cellules souches préalablement explorée par la SdFFF [216]. A titre d'exemple, les neuroblastomes, provenant d'un défaut de différenciation de cellules embryonnaires, semblent être concernés par une population de cellules souches cancéreuses souvent responsable de la résistance et de l'échappement thérapeutiques de ces cancers.

Développement instrumental et méthodologique.

L'adaptation de la SdFFF au monde de la biologie s'est faite depuis des années par une adaptation instrumentale et technologique. A l'image de l'ensemble des méthodes de tri cellulaire, la SdFFF doit respecter l'intégrité fonctionnelle de la cellule tout en permettant la collection de fractions purifiées et stériles. La réalisation de ces exigences a nécessité :

- la mise en place d'une nouvelle procédure d'injection dite « dans le flux »,
- l'utilisation de matériaux adaptés,
- la mise en œuvre d'un mode d'élution biocompatible, le mode Inertiel ou « Hyperlayer »

et,

- la validation d'une procédure de nettoyage et de décontamination du dispositif.

Procédure d'injection. Les cellules sont injectées directement dans le flux de phase mobile au niveau de la paroi d'accumulation. Ce mode limite les contacts avec la paroi, comme cela

est le cas avec le mode « en arrêt de flux ». Cependant, cette technique a des conséquences sur le rendement global, par élution d'une partie de la population dans le volume mort.

Paroi du canal. L'utilisation de matériaux biocompatibles tels que les tubulures peek® est essentielle au tri cellulaire. De même, le polystyrène, matériau très hydrophobe utilisé pour les parois d'accumulation et de déplétion, a réduit considérablement le risque d'adhésion des cellules aux parois. Cette amélioration des matériaux utilisés a permis également de simplifier la nature de la phase mobile, composée uniquement de PBS stérile. Ce tampon compatible avec la viabilité des cellules, peut être supplémenté d'une petite quantité d'antifongiques et d'antibiotiques. Cela est parfois nécessaire, lorsque les risques de contamination sont importants, lors de l'élution de cellules issues de tissus, par exemple.

Mode d'élution. Le mode d'élution des cellules est le mode Inertiel ou « Hyperlayer ». Il dépend de la balance entre les forces hydrodynamiques d'élévation et le champ multigravitationnel appliqué. Il conduit les particules à se focaliser dans l'épaisseur du canal selon leur taille et leur densité dans des lignes de flux et donc de vitesses différentes. En effet, dans une stratégie de séparation cellulaire ou de particules microniques, du fait de l'importante sélectivité de ce mode en fonction de la taille et de la densité, ainsi que du faible risque d'interaction particules / paroi qu'il offre, le mode Inertiel est un modèle de choix, dont on doit assurer la mise en œuvre. Ces interactions peuvent être préjudiciables à la viabilité des cellules éluées et peuvent également biaiser les résultats lorsque la SdFFF est utilisée pour l'étude de processus biologiques tels que l'apoptose ou la différenciation. De plus, le contact avec la paroi d'accumulation est responsable de l'empoisonnement du canal. Ce dernier est fortement limité grâce à la validation d'une procédure de nettoyage et de décontamination qui, à ce jour, a prouvé toute son efficacité.

Procédure de nettoyage et de décontamination. Même si l'efficacité de la mise en œuvre du mode Inertiel dans la limitation des interactions cellules / paroi d'accumulation est démontrée, une faible partie des cellules éluées va adhérer de façon réversible, ou non, à la paroi d'accumulation et entraîner l'empoisonnement du canal. Pour éviter l'accumulation de matériel biologique, nous procédons à un nettoyage systématique basé sur un cycle choc hypo-osmotique-déprotéinisant [304]. L'ensemble du dispositif est soumis à un débit de 2 mL / min avec des cycles de 30 min aux solutions suivantes : eau distillée stérile / clenaz® (déprotéinisant) / eau distillée

stérile / hypochlorite de sodium 3° chlorométrique (décontaminant) / eau distillée stérile. Le dispositif est alors prêt pour de nouvelles séparations.

Applications au tri de bio-particules : amidons et cellules.

Les travaux de cette thèse se sont inscrits dans la continuité du développement et de la mise au point de la biocompatibilité de nos prototypes. Ces études ont porté sur les applications de la SdFFF pour le tri, l'identification et la purification d'espèces biologiques diverses : biopolymères et lignées cellulaires cancéreuses. Ces applications peuvent se décliner en 4 points :

1) L'utilisation de la SdFFF dans le **monitoring de processus biologiques**. La comparaison des fractogrammes obtenus avec des populations témoins et traitées permet la détection et la caractérisation de réactions biologiques.

2) **L'isolement de sous-populations d'intérêt** telles que des cellules pré-apoptotiques ou différenciées. Ces sous-populations pouvant ensuite servir de modèles d'étude cellulaires.

3) **Etude de la cinétique de processus biologiques**. Dans ce cas, le tri par SdFFF est associé à un **procédé de lavage ou washout**. Cela signifie que le phénomène biologique est initié par un agent inducteur mais que ce dernier n'est plus en contact avec les particules après tri par SdFFF.

4) une application plus récente de la SdFFF s'inscrit dans l'étude de **l'écologie de populations très complexes**.

Etude de la dégradation enzymatique des amidons.

La première approche de ces travaux de thèse a été une participation aux études menées sur la dégradation enzymatique des amidons, mono- et bi-modaux [327, 341]. Ce travail m'a permis de me familiariser avec l'outil, les modes d'élution (balance taille / densité) et la collection des fractions.

Le but était d'utiliser, dans un premier temps, les capacités de la SdFFF pour le monitoring de la dégradation enzymatique d'amidons de riz et de blé natifs par une α -amylase à basse température. Ainsi après cette étape de calibration, la SdFFF apparaît comme un outil permettant, par le simple enregistrement des fractogrammes, le suivi de cette réaction.

En même temps que le monitoring, la possibilité offerte par la SdFFF de collecter des fractions amène, par le suivi de la variation de la distribution de taille des granules élués dans chaque fraction (analyse par cytométrie en flux ou par Coulter Counter®), à mieux comprendre l'impact de l'activité enzymatique sur la balance taille / densité [341, 354]. La corrélation entre

variation du diamètre moyen et R_{obs} permet alors de déterminer si l'hydrolyse se produit à densité constante ou non [2-4, 14, 17-25]. Il faut rappeler que selon le mode « Hyperlayer », à densité égale, les particules les plus grandes génèrent le plus de forces hydrodynamiques et sont situées plus haut dans le canal. Elles sont éluées avant les particules de plus faible diamètre. A taille égale, les particules les plus denses sont plus sensibles au champ de gravité et sont éluées en dernier. Dans une population de forte polydispersité en taille et densité, comme le sont les amidons, les particules les plus grandes et les moins denses seront éluées en premier, alors que les plus petites et les plus denses le seront en dernier. Ainsi, la collection de fractions et l'isolement de populations ont permis l'étude cinétique de la lyse enzymatique des deux principales populations d'amidon. La SdFFF est donc apparue comme une méthode efficace pour le suivi de la dégradation enzymatique des amidons mono- et bimodaux. Ceci a ouvert un nombre important de perspectives telles que l'utilisation de la technique pour le « screening » d'enzymes, d'amidons et de conditions d'hydrolyse diverses. L'association de la SdFFF avec des techniques spécifiques d'analyse structurale des grains : diffraction des rayons X, balayage différentiel calorimétrique, microscopie électronique à balayage ou à transmission, analyse de densité permettrait de mieux comprendre les mécanismes enzymatiques ou la structure des grains d'amidon.

Cette étude nous a permis d'appréhender les 3 premiers points d'implication de la SdFFF : 1) le monitoring d'un évènement biologique et 2) l'étude cinétique de cet évènement grâce à 3) l'isolement de sous-populations d'intérêt.

Ces résultats ont mis en exergue l'importance de la balance taille / densité qui a un rôle majeur dans les populations très polydisperses que sont les lignées cellulaires. Les résultats obtenus avec les amidons nous ont permis d'étendre ce concept de monitoring à des populations et des processus biologiques beaucoup plus complexes. A partir de là, nous ne nous sommes intéressés qu'au domaine de l'oncologie. Des lignées cellulaires cancéreuses ont été analysées par SdFFF, et les conséquences de l'induction de processus biologiques tels que l'induction de la différenciation ou de la mort cellulaire par apoptose.

Etude de l'apoptose des cellules d'ostéosarcome induite par la diosgénine.

La première application en oncologie s'est faite sur un modèle connu : l'apoptose des cellules d'ostéosarcome humain, 1547, induite par la diosgénine [32]. Il est maintenant clairement établi qu'il existe des altérations des processus d'apoptose dans de nombreuses pathologies et en particulier dans le cancer [37]. En effet, les cellules cancéreuses perdent souvent certains paramètres de différenciation pour pouvoir acquérir une capacité de croissance et de migration incontrôlée ce qui les rendent insensibles à l'apoptose. Enfin, l'altération des processus apoptotiques est à l'origine de la résistance des cellules tumorales aux radio- et chimio-thérapies et à leur élimination par le système immunitaire.

L'apoptose se définit comme la mort cellulaire programmée. C'est un processus biologique complexe qui fait appel à plusieurs voies de signalisation. Les ostéosarcomes sont des tumeurs rares mais dont les conséquences sont souvent dramatiques. Les complications peuvent se traduire par l'apparition de métastases, la nécessité d'un recours à l'amputation et aboutir à la mort. Les chimio-thérapies actuelles tendent à induire au niveau de la masse tumorale, la destruction de ces cellules cancéreuses par apoptose. L'équipe du Professeur Beneytout a mis en évidence le rôle apoptotique d'un stéroïde végétal, la diosgénine sur une lignée d'ostéosarcome humain, les cellules 1547 [130, 131]. Bien que ce phénomène ait été largement étudié, les mécanismes d'action de la diosgénine restent encore à élucider.

Comme pour les amidons, nous avons montré une corrélation directe entre l'induction de l'événement biologique et la variation des profils d'élution en terme de forme de pic ou de facteur de rétention (R_{obs}). L'induction de l'apoptose s'accompagne de variations importantes et complexes de la taille et de la densité cellulaires [31, 130], se traduisant par des évolutions spécifiques des profils d'élution. Le monitoring de ce processus apoptotique a été réalisé en comparant deux dispositifs, mettant en oeuvre des canaux d'épaisseurs différentes : 125 et 175 μm . Le canal de 125 μm permet, une analyse rapide, requiert une faible quantité d'échantillon et limite la dilution des populations recueillies. Cependant, comme l'indique la comparaison des valeurs expérimentales du facteur de sélectivité Sd_{obs} (tableau RIII-III), ce canal ne semble pas prendre en compte la variation de densité liée à l'induction d'apoptose, aussi bien que le canal de 175 μm . A l'inverse, ce dernier favorise un élargissement des pics d'élution, un accroissement des temps et des facteurs de rétention, impliquant l'utilisation d'une quantité importante d'échantillon. Ce canal semble, dès lors, moins adapté pour le monitoring.

Dans notre modèle d'étude : apoptose des cellules 1547 induite par la diosgénine, nous avons suivi le processus par Sd_{FFFF} . Des études précédentes réalisées au sein du laboratoire sur le même modèle [130], ont montré une variation significative des profils d'élution dès 6 h d'incubation

[32]. Ces résultats nous avaient semblé très intéressants puisque la SdFFF permettait une détection précoce du processus peu ou pas détecté par la majorité des tests biologiques utilisés classiquement pour la caractérisation de l'apoptose.

Nous avons confirmé que 6 h d'incubation suffisaient pour la détection de l'apoptose par SdFFF, bien que les observations microscopiques des cultures cellulaires ne montraient qu'une faible quantité de figures apoptotiques.

Nous avons alors envisagé de trier les cellules pré-apoptotiques, c'est-à-dire, engagées dans une étape précoce de l'apoptose. Le tri est réalisé sur une population traitée, et les fractions recueillies sont remises en culture en absence de diosgénine. Ceci induit l'élimination de l'agent inducteur (processus de lavage ou « washout »), permettant l'observation du phénomène induit initialement, ainsi que son éventuelle cinétique, sans nouvelle interférence avec la diosgénine. L'analyse des populations triées s'est faite après 72 h de culture afin de laisser le processus apoptotique parvenir à son terme. L'isolement de ces sous-populations constitue le deuxième point d'impact de la SdFFF.

L'isolement de telles cellules n'est alors intéressant que s'il conduit à l'amélioration de la sensibilité des tests spécifiques de diagnostic de l'état apoptotique, ou s'il produit une population modèle sur laquelle il devient possible de suivre de façon spécifique la cinétique et la signalisation apoptotiques. Ceci correspond aux cellules dites pré-apoptotiques, c'est-à-dire la population au stade précoce du processus.

Comme nous l'avons décrit précédemment, une faible épaisseur de canal favorise les forces ascensionnelles et donc un tri basé sur la taille, alors qu'une augmentation d'épaisseur favorise une meilleure prise en charge des variations de densité en privilégiant les forces gravitationnelles (équations 5 et 6, p11).

Seul le canal de 175 μm d'épaisseur a réussi la performance de trier une sous-population de cellules pré-apoptotiques, ainsi qu'une autre fraction qui pouvait apparaître comme intéressante, composée de cellules modifiées par la diosgénine (cytoplasme étalé) mais non apoptotiques. La première fraction permet d'augmenter la sensibilité des tests de caractérisation de l'apoptose et c'est ce que nous avons illustré par le test ELISA (Fig. RIII-7). De plus, cette fraction permettrait d'étudier la signalisation apoptotique dès un stade précoce du processus. La deuxième fraction pourrait expliquer les effets de la diosgénine sur le cycle cellulaire et permettrait de comprendre la cinétique d'action de celle-ci. Comme la diosgénine induit un arrêt du cycle en G0/G1 et qu'ensuite seules ces cellules sont sensibles aux effets de la diosgénine, il faudrait remettre cette fraction à incuber de nouveau avec la diosgénine, pour voir si ces cellules partent effectivement en apoptose.

Cette étude a donné de nombreuses perspectives d'utilisation de la SdFFF. Le suivi de phénomènes biologiques par SdFFF revêt alors plusieurs facettes. En effet, le monitoring a été ou pourrait être utilisé :

- pour suivre les effets d'une même drogue sur différentes lignées cellulaires. Les effets apoptotiques de la diosgénine ont déjà été étudiés sur la lignée érythroleucémique humaine HEL [213], et sur la lignée d'ostéosarcome humain 1547 [131].

- pour faire un « screening » de molécules sur une même lignée : des molécules chimiquement apparentées à la diosgénine (tigogénine, hécogénine...) pourraient être testées sur la lignée 1547, et leurs effets suivis par SdFFF.

- pour tester les effets d'une molécule à différentes concentrations. La diosgénine à 10 μM a un effet différenciant sur les HEL ce qui se traduit par un décalage vers la gauche du pic cellulaire en comparaison de celui du fractogramme témoin [31]. A 40 μM cette même drogue est apoptotique sur les HEL et se traduit par un décalage vers la droite du pic (Fig.26) [213].

Cette étude a servi de tremplin à l'implication de la SdFFF dans le domaine biologique complexe de la neuro-oncologie. Les pathologies cancéreuses touchant le système nerveux ont souvent de lourdes conséquences physiologiques et, de par leur complexité, restent encore méconnues. Les thérapeutiques actuellement déployées pour lutter contre ces cancers ont une efficacité limitée, notamment pour les glioblastomes et les neuroblastomes.

Ecologie de la lignée IMR-32.

Notre étude avait pour but d'isoler les phénotypes cellulaires présents au sein de lignées cancéreuses très hétérogènes et complexes telles que les lignées neuroblastiques. Ces tumeurs, et les lignées qui en dérivent, sont constituées de différents phénotypes cellulaires correspondant à divers stades de différenciation [416]. Au sein de ces lignées, 2 types cellulaires principaux sont décrits : des cellules adhérentes, différenciées dites « fibroblastoïdes » ou type-S (S pour stromal) et des cellules neuroblastoïdes, de type-N organisées en amas, ayant des caractéristiques de cellules immatures. Nous savons que les cellules neuroblastiques ont la capacité de se différencier spontanément *in vitro* et *in vivo* [416].

Nous avons utilisé la lignée IMR-32 qui, en culture, présente de nombreux amas neuroblastoïdes, de type-N, associés à quelques cellules de type-S. L'isolement de ces sous-populations a permis de mieux comprendre les mécanismes et la cinétique de différenciation qui les relie, afin d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques en étudiant leur réponse spécifique à différentes drogues.

Dans cette étude, la SdFFF est apparue comme un outil indispensable puisque les deux phénotypes, présents au sein de cette lignée (Fig. RIV-1), apparaissaient, en cytométrie en flux, comme une population unique et ne pouvaient donc pas être triés par cette technique. Grâce à la mise en place du mode « Hyperlayer », le tri par SdFFF a isolé deux phénotypes différents de cellules de type-N ayant des caractéristiques morphologiques et biologiques très différentes.

Le premier phénotype, isolé dans la fraction 3, nous a permis de comprendre les cinétiques de différenciation : les cellules de type-N organisées en amas neuroblastoïdes sont des cellules indifférenciées, prolifératives qui peuvent se différencier spontanément en cellules de type-S. Nous avons mis en évidence un phénotype intermédiaire, les cellules de type-I exprimant la PSA-N-CAM qui se détachent à la périphérie des amas neuroblastoïdes et se différencient en cellules de type-S. Ces cellules ont un potentiel migratoire et pourraient jouer un rôle dans la formation des métastases.

Le deuxième phénotype, isolé dans la fraction 1, pourrait être composé, en majorité, de cellules souches cancéreuses. Ces cellules de type-N s'organisent sous forme d'amas neuroblastoïdes denses et volumineux qui grossissent sans donner de cellules de type-S ; ces cellules sont quiescentes et expriment peu de marqueurs biologiques. Nous savons que les tumeurs neuroblastiques résultent, en grande partie, d'une altération de migration, voire d'un déficit de différenciation des cellules sympathiques dérivant de la crête neurale. Ces défauts de différenciation peuvent également s'expliquer par la présence de cellules souches. Or, de nombreuses études s'entendent à montrer la présence de cellules souches, dans les cancers solides. Cette théorie a d'abord été vérifiée dans les leucémies, puis dans les cancers du sein et récemment dans les cancers neurologiques, glioblastomes et neuroblastomes [27, 28, 195-203].

Ainsi, l'isolement de cette sous-population est remarquable, puisque ces cellules pourraient être impliquées dans les processus de résistance aux chimio et radio-thérapies [177] qui agissent sur les cellules mitotiques [179]. La recherche sur les cellules souches cancéreuses promet également de nouvelles découvertes sur le mode de propagation des cancers, la métastase. Le modèle alternatif proposé aujourd'hui est le suivant : de nombreuses cellules d'une tumeur primaire se répandent dans le corps, mais une seconde tumeur ne peut se former que lorsqu'une cellule souche rare atteint un nouvel emplacement [148, 196, 198, 202].

Nous avons alors testé la réponse spécifique de ces phénotypes d'intérêt à différents inducteurs de mort et de différenciation. Nous savons que la lignée IMR-32 est déficiente en caspase-8, acteur majeur des voies de signalisation des récepteurs de mort tels que Fas. Cela implique que l'activation de Fas n'entraîne pas d'apoptose dans ces cellules. Nous n'avons effectivement pas induit d'apoptose sous les effets de Fas L ni d'un agoniste de Fas, le 7C11, dans la lignée IMR-32. Cependant, et cela met en exergue la pertinence du tri par SdFFF, nous avons

testé ces inducteurs sur les fractions cellulaires afin de voir si les effets de résistance observés sur la population totale pouvait être incriminés à l'un de ces phénotypes. Nos résultats semblent indiquer que tous les types cellulaires soient résistants (Fig. RV-2 et 3).

Nous avons alors testé la diosgénine, dont les effets apoptotiques sont reconnus [32, 129-131, 144-147, 412, 413] et qui ont fait l'objet de notre étude précédente. Cette molécule agit sur des récepteurs aux oestrogènes dont le mécanisme d'action diffère de celui des récepteurs de mort. De plus, les études du Dr Corbière ont montré que les voies de signalisation apoptotique de la diosgénine ne faisaient pas ou peu appel à l'activation de la caspase-8. Nos résultats montrent, de manière innovante que la diosgénine induit l'apoptose dans la lignée IMR-32. La diosgénine semble avoir un effet apoptotique, spécifiquement sur les cellules différenciées de type-S. Ces effets sont nettement visibles sur PF3 et PF2 donc, là encore, grâce à l'étude comparative des fractions (Fig. RV-4). Ce résultat est primordial puisqu'il a des répercussions majeures :

1) sur la détermination de la nature des cellules de type-N isolée en PF1. Certaines cellules résistent aux effets apoptotiques de la diosgénine. Des amas encore visibles et volumineux persistent, ce qui renforce l'hypothèse que ce phénotype comporte des cellules souches cancéreuses (quiescence, immaturité, expression faible des marqueurs biologiques) ;

2) sur l'investigation d'une nouvelle stratégie thérapeutique et la mise en place d'une bithérapie : induction préalable d'une différenciation des cellules de type-N pour les rendre sensibles aux effets apoptotiques de la diosgénine.

Nous avons alors cherché à induire la différenciation des cellules IMR-32. Nous avons testé les effets de l'acide rétinoïque, de la diosgénine et de la rosiglitazone. Seule la rosiglitazone à 20 μ M induit la différenciation, effet particulièrement visible sur PF3 (Fig. RV-7). Les résultats précédents ont montré que ces cellules ont une dynamique de différenciation active : type-N devenant type-I devenant type-S seulement après 24 h de remise en culture, après tri. La rosiglitazone pourrait potentialiser et optimiser leur cinétique de différenciation. Nous pouvons supposer que ces cellules soient dans une phase du cycle propice, leur permettant d'être sensibles aux effets de la diosgénine. Comme pour la diosgénine, les cellules isolées en PF1 répondent plus faiblement aux effets de la rosiglitazone. Si ces cellules sont des cellules souches cancéreuses, nous pouvons supposer que ces cellules doivent d'abord se différencier, entrer dans le cycle et devenir des cellules de type-S.

Nous avons ensuite observé les effets de la bithérapie, rosiglitazone à 20 μ M et diosgénine à 40 μ M. L'observation générale de cette bithérapie semble prometteuse puisque nous observons la quasi disparition des amas neuroblastoïdes en PF3, et une diminution nette en PF1 ; les amas

encore visibles étant constitués de cellules apoptotiques. Cependant, contrairement aux effets de la diosgénine seule, nous voyons encore des cellules de type-S mais toutes présentent des expansions cytoplasmiques caractéristiques. La diosgénine bloque les cellules en phase G0 / G1 et les cellules sensibles aux effets apoptotiques de la diosgénine sont bloquées dans cette phase du cycle mitotique. Ainsi la diosgénine peut agir sur les cellules, en modifiant leur cycle et leur morphologie (expansions cytoplasmiques) sans induire leur apoptose. Puisque la fraction PF3 contient des cellules avec des états de différenciation variables, type-N, type-I et type-S, nous pouvons donc penser que les cellules initient leur différenciation de façon asynchrone sous l'effet de la rosiglitazone et que seules certaines d'entre elles peuvent entrer en apoptose. De plus, le nombre de cellules différenciées augmente sous l'effet de la rosiglitazone donc les effets de la diosgénine paraissent atténués. Il semblerait que 24 h d'incubation avec la diosgénine ne soient pas suffisantes pour entraîner une apoptose massive des cellules.

Enfin, les effets de cette bithérapie sur PF1 montre que ces cellules sont les plus résistantes. Cependant une optimisation des temps d'incubation pourrait améliorer les effets de ces drogues. Là encore, on peut assimiler ce comportement à celui des cellules souches cancéreuses. D'après les résultats obtenus, ces cellules sont dans un état de quiescence (Fig. RIV-7) ce qui pourrait expliquer leur résistance aux agents utilisés classiquement dans les protocoles de chimiothérapies classiques. L'observation microscopique de ces cellules montre qu'elles s'organisent en amas très denses (Fig. RIV-4) ce qui pourrait les rendre inaccessibles aux molécules. Nous pouvons supposer que les molécules différenciantes et apoptotiques ne sont efficaces que lorsque les cellules sont dans une phase définie du cycle.



CONCLUSIONS / PERSPECTIVES

En conclusion, l'ensemble de ces résultats montre que l'adaptation instrumentale et technologique de la SdFFF au monde biologique est une réussite. Tous les efforts déployés par les chercheurs et enseignant-chercheurs, au sein du laboratoire de Chimie Analytique dirigé par Monsieur Le Professeur Cardot ont optimisé l'appareillage de SdFFF afin d'en faire un outil de tri cellulaire efficace et validé. Nos recherches se sont centrées autour des thématiques développées en oncologie et plus récemment en neuro-oncologie, domaines pour lesquels la SdFFF s'est illustrée dans des applications nombreuses et variées. Cette technique est simple, douce, rapide, peu onéreuse, non invasive ne nécessitant pas de marquages préalables des cellules. Ce dernier point est crucial puisqu'il rend possible l'utilisation ultérieure des cellules collectées ou lorsque le marquage est impossible. En effet, certains marqueurs biologiques ne peuvent pas être identifiés, soit parce que le couplage au marqueur entraîne des perturbations métaboliques de la cellule soit parce qu'il n'existe pas d'anticorps permettant leur caractérisation.

La SdFFF a permis, non seulement, le suivi de processus biologiques induits, l'étude de mécanismes physio-pathologiques, la compréhension des cinétiques complexes de différenciation...mais également l'isolement de sous-populations d'intérêt pouvant être utilisées à des fins biologiques, diagnostiques voire même thérapeutiques.

En effet, la mise en œuvre du mode « Hyperlayer » est performante pour la collection de fractions stériles, viables en préservant l'intégrité fonctionnelle et l'état de différenciation de ces cellules. Ce dernier point est primordial lors de l'étude des phénomènes d'apoptose et de différenciation. Nous avons établi la preuve que nos résultats sont reproductibles et répétables permettant, en routine, la collection de fractions servant ensuite de modèles.

La collecte de fractions après élution des cellules en mode « Hyperlayer », tient compte de la balance taille / densité. Cela nous a aidé à :

1. Comprendre les mécanismes de digestion enzymatique des grains d'amidon de riz et de blé par une α -amylase.

2. Isoler des populations d'intérêt : cellules pré-apoptotiques c'est-à-dire induites dans un stade précoce du processus apoptotique. Ce phénomène, bien que biologiquement peu significatif, a pu être suivi par SdFFF. En terme de recherche fondamentale, cette fraction isolée de cellules pré-apoptotiques est apparue comme un modèle d'étude fort intéressant pour explorer la cinétique des mécanismes d'action de la diosgénine, ainsi que les voies d'induction de l'apoptose encore méconnues.

Une population de cellules modifiées, présentant des expansions cytoplasmiques, mais non apoptotiques, a été isolée. Il conviendrait d'étudier le cycle de ces cellules permettant de confirmer que la diosgénine agit, en bloquant les cellules en phase G0 / G1 avant d'induire l'apoptose. Il

faudrait également incuber ces cellules avec la diosgénine pour voir si elles sont devenues sensibles aux effets apoptotiques.

De façon assez péremptoire, nous pourrions envisager de développer des stratégies d'étude à visée diagnostique. Si la SdFFF peut détecter rapidement et de manière très précoce les effets apoptotiques d'une drogue, par simple comparaison des fractogrammes, alors nous pourrions ainsi envisager de tester une molécule que l'on sait efficace *in vitro*, sur un fragment de tumeur après biopsie. Cela permettrait de voir si la tumeur répond à cette drogue ou d'adapter la thérapie à la tumeur et donc au patient...pour cela il serait nécessaire de développer un prototype de SdFFF dédié au diagnostic : canal à faible volume mort par miniaturisation de ses dimensions, limitant ainsi la quantité d'échantillon nécessaire et le temps d'élution

3. Isoler des phénotypes d'intérêt correspondant à des stades différents de différenciation, dans une lignée cellulaire complexe, neuroblastique. Un des phénotypes isolés nous a permis de comprendre la cinétique de différenciation existant entre les différents types cellulaires, type-N, type-I et type-S. Le deuxième phénotype présente des propriétés biologiques caractéristiques des cellules souches cancéreuses. Ces dernières ont un impact fondamental dans les processus de cancérisation, de résistance et d'échappement thérapeutiques ou dans la formation de métastases. La perspective majeure est de caractériser ce phénotype cellulaire par l'utilisation de marqueurs biologiques des cellules souches neurales, tels que le CD 133. De plus, des études complémentaires de prolifération et de tumorigénicité devront être effectuées car nous envisageons de greffer les fractions d'intérêt sur des souris pour étudier leur comportement *in vivo*. Il conviendrait également de faire une étude cytogénétique de ces fractions : amplification du *MYCN* ainsi que l'expression des récepteurs aux neurotrophines TrK A et TrK B, puisqu'ils ont une valeur pronostique.

Les résultats obtenus avec les drogues différenciante et apoptotique testées doivent être étayés. L'association de ces molécules permet aux cellules 1) de se différencier sous l'effet de la rosiglitazone les rendant 2) sensibles (type-S) aux effets pro-apoptotiques de la diosgénine. Nous avons vu qu'il était difficile de quantifier les effets différenciants de la rosiglitazone. Nous pourrions étudier l'expression du neurofilament, spécifique des cellules différenciées. Nous envisageons également d'étudier les effets différenciants de la rosiglitazone par SdFFF. Les fractions isolées en routine seront analysées par le dispositif adapté au diagnostic. Les fractogrammes obtenus pour ces fractions seront comparés à ceux obtenus avec ces mêmes fractions traitées par la rosiglitazone.



BIBLIOGRAPHIE GENERALE

1. Giddings J.C. New separation concept based on a coupling of concentration and flow nonuniformities. **Separation Sci.**, 1 (1966) p. 123-125.
2. Giddings J.C. Field-flow fractionation: analysis of macromolecular, colloidal, and particulate materials. **Science**, 260 (1993) p. 1456-65.
3. Giddings J.C., *The Field-Flow Fractionation Family: Underlying Principles*, in *Field-Flow Fractionation Handbook*, Schimpf, M.E., Caldwell, K. and Giddings, J.C., Editors. 2000, John Wiley & Sons, Inc.: New York. p. 3-30.
4. Kowalkowski T., Buszewski B., Cantado C. and Dondi F. *Field-flow fractionation: theory, techniques, applications and the challenges*. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, 36 (2006) p. 129-135.
5. Reschiglian P., Zattoni A., Roda B., Michelini E. and Roda A. *Field-flow fractionation and biotechnology*. **Trends Biotechnol.**, 23 (2005) p. 475-483.
6. Myers M.N. *Overview of field-flow fractionation*. **J. Microcolumn Sep.**, 9 (1997) p. 151-162.
7. Williams S.K.R. and Lee D. Field-flow fractionation of proteins, polysaccharides, synthetic polymers, and supramolecular assemblies. **J. Sep. Sci.**, 29 (2006) p. 1720-1732.
8. Cardot P.J.P., Denizot Y. and Battu S., Cell sorting using Sedimentation Field-Flow Fractionation: methodologies, problems, and solutions - A "Cellulomics" Concept., in *Encyclopedia of Chromatography*, Cazes, J., Editor. 2005, M. Dekker Inc.: New York. p. 282-291.
9. Chianea T., Assidjo N.E. and Cardot P.J.P. Sedimentation field-flow-fractionation: emergence of a new cell separation methodology. **Talanta**, 51 (2000) p. 835-847.
10. Giddings J.C. and Schure M.R. *Theoretical analysis of edge effects in field-flow fractionation*. **Chem. Eng. Sci.**, 42 (1987) p. 1471-9.
11. Battu S., Cook-Moreau J. and Cardot P.J.P. *Sedimentation field-flow fractionation: methodological basis and applications for cell sorting*. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, 25 (2002) p. 2193-2210.
12. Davis J.M., *Band broadening and plate height*, in *Field flow fractionation handbook*, Schimpf, M.E., Caldwell, K.D. and Giddings, J.C., Editors. 2000, John Wiley & Sons, Inc.: New York. p. 49-70.
13. Davis J.M. General retention theory for sedimentation field-flow fractionation. **Anal. Chem.**, 58 (1986) p. 161-4.
14. Williams P.S., Lee S. and Giddings J.C. Characterization of hydrodynamic lift forces by field-flow fractionation. Inertial and near-wall lift forces. **Chem. Eng. Commun.**, 130 (1994) p. 143-66.

- 15.Schure M.R., Schimpf M.E. and Schettler P.D., *Retention-Normal mode.*, in *Field-flow fractionation handbook*, Schimpf, M.E., Caldwell, K.D. and C., G.J., Editors. **2000**, John Wiley & Sons, Inc.: New York. p. 31-44.
- 16.Caldwell K.D., *Steric Field-Flow Fractionation and Steric transition*, in *Field-flow fractionation handbook*, Schimpf, M.E., Caldwell, K.D. and Giddings, J.C., Editors. **2000**, John Wiley & Sons, Inc.: New York. p. 79-94.
- 17.Caldwell K.D., Cheng Z.Q., Hradecky P. and Giddings J.C. *Separation of human and animal cells by steric field-flow fractionation. Cell Biophys.*, 6 (1984) p. 233-251.
- 18.Caldwell K.D., Nguyen T.T., Murray T.M., Myers M.N. and Giddings J.C. *Observations on anomalous retention in steric field-flow fractionation. Sep. Sci. Technol.*, 14 (1979) p. 935-46.
- 19.Giddings J.C. *Hyperlayer field-flow fractionation. Am. Lab.*, 24 (1992) p. 20D, 20F-20M.
- 20.Chmelik J. Different elution modes and field programming in gravitational field-flow fractionation; I. A theoretical approach. **J. Chromatogr. A**, 845 (1999) p. 285-291.
- 21.Martin M. and Williams P.S. *Theoretical basis of field-flow fractionation. NATO ASI Ser., Ser. C*, 383 (1992) p. 513-80.
- 22.Plockova J., Matulik F. and Chmelik J. Different elution modes and field programming in gravitational field-flow fractionation IV. Field programming achieved with channels of non-constant cross-sections. **J. Chromatogr. A**, 955 (2002) p. 95-103.
- 23.Plockova J. and Chmelik J. Different elution modes and field programming in gravitational field-flow fractionation III. Field programming by flow-rate gradient generated by a programmable pump. **J. Chromatogr., A**, 918 (2001) p. 361-370.
- 24.Tong X. and Caldwell K.D. Separation and characterization of red blood cells with different membrane deformability using steric field-flow fractionation. **J. Chromatogr. B**, 674 (1995) p. 39-47.
- 25.Tong X., Ash J.F. and Caldwell K.D. Rapid swelling of a CHO-K1 aspartate/glutamate transport mutant in hypo-osmotic medium. **J. Membr. Biol.**, 156 (1997) p. 131-139.
- 26.Williams P.S., Koch T. and Giddings J.C. Characterization of near-wall hydrodynamic lift forces using sedimentation field-flow fractionation. **Chem. Eng. Commun.**, 111 (1992) p. 121-47.
- 27.Allan A.L., Vantuyghem S.A., Tuck A.B. and Chambers A.F. Tumor dormancy and cancer stem cells: implications for the biology and treatment of breast cancer metastasis. **Breast Dis.**, 26 (2007) p. 87-98.

28. McCulloch E.A. Toward a leukemia treatment strategy based on the probability of stem cell death: an essay in honor of Dr. Emil J Freireich. **Clin. Cancer Res.**, 3 (1997) p. 2676-2681.
29. Schimpf M.E., *Resolution and fractionating power*, in *Field-Flow Fractionation handbook.*, Schimpf, M.E., Caldwell, K.D. and Giddings, J.C., Editors. 2000, John Wiley & Sons, Inc.: New York. p. 71-79.
30. Myers M.N. and Giddings J.C. Properties of the transition from normal to steric field-flow fractionation. **Anal. Chem.**, 54 (1982) p. 2284-9.
31. Leger D.Y., Battu S., Liagre B., Beneytout J.L. and Cardot P.J.P. Megakaryocyte cell sorting from diosgenin-differentiated human erythroleukemia cells by sedimentation field-flow fractionation. **Anal. Biochem.**, 355 (2006) p. 19-28.
32. Bégaud-Grimaud G., Battu S., Liagre B., Leger D.Y., Beneytout J.L. and Cardot P.J.P. Pre-apoptotic sub-population cell sorting from diosgenin apoptosis induced 1547 cells by two Sedimentation Field-Flow Fractionation devices. **J. Chromatogr. A**, 1128 (2006) p. 194-202.
33. Clédat D., Battu S., Mokri R. and Cardot P.J.P. Rice starch granule characterization by flow cytometry scattering techniques hyphenated with sedimentation field-flow fractionation. **J. Chromatogr. A.**, 1049 (2004) p. 131-138.
34. Sanz R., Cardot P., Battu S. and Galceran M.T. Steric-Hyperlayer Sedimentation Field Flow Fractionation and Flow Cytometry Analysis Applied to the Study of *Saccharomyces cerevisiae*. **Anal. Chem.**, 74 (2002) p. 4496-4504.
35. Opferman J.T. *Homeostatic signaling: the positive side of negative feedback*. **Curr. Opin. Neurobiol.**, 17 (2007) p. 318-324.
36. Verhagen A.M. and Vaux D.L. *Molecular mechanisms of apoptosis: an overview*. **Results Probl. Cell Differ.**, 23 (1999) p. 11-24.
37. Hanahan D. and Weinberg R.A. *The hallmarks of cancer*. **Cell Adhes. Commun.**, 100 (2000) p. 57-70.
38. Opferman J.T. *Apoptosis in the development of the immune system*. **Cell Death Differ.**, 15 (2007) p.
39. Busch H. *Molecular lesions in cancer*. **Mol. Cell Biochem.**, 61 (1984) p. 111-130.
40. Cattaruzza S. and Perris R. Proteoglycan control of cell movement during wound healing and cancer spreading. **Matrix Biol.**, 24 (2005) p. 400-417.
41. Balasubramanian S. and Ecker R.L. Keratinocyte proliferation, differentiation, and apoptosis-Differential mechanisms of regulation by curcumin, EGCG and apigenin. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, (2007) p.

- 42.Rezácová M., Vávrová J., Vokurková D. and Zášková D. Effect of valproic acid and antiapoptotic cytokines on differentiation and apoptosis induction of human leukemia cells. **Gen. Physiol. Biophys.**, 25 (2006) p. 65-79.
- 43.Kerr J.F., Wyllie A.H. and Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, 26 (1972) p. 239-257.
- 44.Horvitz H.R., Sternberg P.W., Greenwald I.S., Fixsen W. and Ellis H.M. *Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode Caenorhabditis elegans*. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, 48 (1983) p. 453-463.
- 45.Wood W., Turmaine M., Weber R., Camp V., Maki R.A., McKercher S.R. and Martin P. *Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos*. **Development**, 127 (2000) p. 5245-5252.
- 46.Clarke P.G., Posada A., Primi M.P. and Castagne V. *Neuronal death in the central nervous system during development*. **Biomed. Pharmacother.**, 52 (1998) p. 356-62.
- 47.Wyllie A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, 284 (1980) p. 555-556.
- 48.Wyllie A.H., Morris R.G., Smith A.L. and Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. **J. Pathol.**, 142 (1984) p. 67-77.
- 49.Messmer U.K., Briner V.A. and Pfeilschifter J. Basic fibroblast growth factor selectively enhances TNF-alpha-induced apoptotic cell death in glomerular endothelial cells: effects on apoptotic signaling pathways. **J. Am. Soc. Nephrol.**, 11 (2000) p. 2199-2211.
- 50.Zeiss C.J., Neal J. and Johnson E.A. *Caspase-3 in postnatal retinal development and degeneration*. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 45 (2004) p. 964-970.
- 51.Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. **Nat. Rev. Cancer**, 2 (2002) p. 420-430.
- 52.Lautrette C., Cardot P.J.P., Vermot-desroche C., Wijdenes J., Jauberteau M.O. and Battu S. *SdFFF Purification of Immature Neural Cells from a Human Tumor Neuroblastoma Cell Line*. **J. Chromatogr. B.**, 791 (2003) p. 149-160.
- 53.Giraud S., Bessette B., Boda C., Lalloue F., Petit D., Mathonnet M. and Jauberteau M.O. In vitro apoptotic induction of human glioblastoma cells by Fas ligand plus etoposide and in vivo antitumour activity of combined drugs in xenografted nude rats. **Int. J. Oncol.**, 30 (2007) p. 273-81.

54. Riffkin C.D., Gray A.Z., Hawkins C.J., Chow C.W. and Ashley D.M. Ex vivo pediatric brain tumors express Fas (CD95) and FasL (CD95L) and are resistant to apoptosis induction. **Neuro. Oncol.**, 3 (2001) p. 229-240.
55. Yount G.L., Levine K.S., Kuriyama H., Haas-Kogan D.A. and Israel M.A. *Fas (APO-1/CD95) signaling pathway is intact in radioresistant human glioma cells.* **Cancer Res.**, 59 (1999) p. 1362-1365.
56. Desbarats J., Birge R.B., Mimouni-Rongy M., Weinstein D.E., Palerme J.S. and Newell M.K. *Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation.* **Nat. Cell Biol.**, 5 (2003) p. 118-125.
57. Lambert C., Landau A.M. and Desbarats J. *Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system.* **Apoptosis**, 8 (2003) p. 551-562.
58. Oehm A., Behrmann I., Falk W., Pawlita M., Maier G., Klas C., Li-Weber M., Richards S., Dhein J. and Trauth B.C. et al. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. **J. Biol. Chem.**, 267 (1992) p. 10709-10715.
59. Keppler O.T., Peter M.E., Hinderlich S., Moldenhauer G., Stehling P., Schmitz I., Schwartz-Albiez R., Reutter W. and Pawlita M. *Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus.* **Glycobiology**, 9 (1999) p. 557-569.
60. Papoff G., Hausler P., Eramo A., Pagano M.G., Di Leve G., Signore A. and Ruberti G. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. **J. Biol. Chem.**, 274 (1999) p. 38241-3850.
61. Siegel R.M., Frederiksen J.K., Zacharias D.A., Chan F.K., Johnson M., Lynch D., Tsien R.Y. and Lenardo M.J. *Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations.* **Science**, 288 (2000) p. 2354-2357.
62. Sartorius U., Schmitz I. and Krammer P.H. *Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis.* **ChemBiochem.**, 2 (2001) p. 20-29.
63. Li X., Wang Y., Debatin K.M. and Hug H. *The serine/threonine kinase HIPK2 interacts with TRADD, but not with CD95 or TNF-R1 in 293T cells.* **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 277 (2000) p. 513-517.
64. Sato T., Irie S., Kitada S. and Reed J.C. *FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas.* **Science**, 268 (1995) p. 411-415.
65. Kennedy N.J., Kataoka T., Tschopp J. and Budd R.C. *Caspase activation is required for T cell proliferation.* **J. Exp. Med.**, 190 (1999) p. 1891-1896.

66. MacFarlane M. and Williams A.C. *Apoptosis and disease: a life or death decision*. **EMBO J.**, 5 (2004) p. 674-678.
67. Alderson M.R., Armitage R.J., Maraskovsky E., Tough T.W., Roux E., Schooley K., Ramsdell F. and Lynch D.H. *Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes*. **J. Exp. Med.**, 178 (1993) p. 2231-2235.
68. Freiberg R.A., Spencer D.M., Choate K.A., Duh H.J., Schreiber S.L., Crabtree G.R. and Khavari P.A. *Fas signal transduction triggers either proliferation or apoptosis in human fibroblasts*. **J. Invest. Dermatol.**, 108 (1997) p. 215-219.
69. Jelaska A. and Korn J.H. *Anti-Fas induces apoptosis and proliferation in human dermal fibroblasts: differences between foreskin and adult fibroblasts*. **J. Cell. Physiol.**, 175 (1998) p. 19-29.
70. Zhang H.G., Liu D., Heike Y., Yang P., Wang Z., Wang X., Curiel D.T., Zhou T. and Mountz J.D. *Induction of specific T-cell tolerance by adenovirus-transfected, Fas ligand-producing antigen presenting cells*. **Nat. Biotechnol.**, 16 (1998) p. 1045-1049.
71. Shinohara H., Yagita H., Ikawa Y. and Oyaizu N. *Fas drives cell cycle progression in glioma cells via extracellular signal-regulated kinase activation*. **Cancer Res.**, 60 (2000) p. 1766-1772.
72. Thome M. and Tschopp J. *Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP*. **Nat. Rev. Immunol.**, 1 (2001) p. 50-58.
73. Rathmell J.C. and Goodnow C.C. *The in vivo balance between B cell clonal expansion and elimination is regulated by CD95 both on B cells and in their micro-environment*. **Immunol. Cell Biol.**, 76 (1998) p. 387-394.
74. Trauth B.C., Klas C., Peters A.M., Matzku S., Möller P., Falk W., Debatin K.M. and Krammer P.H. *Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis*. **Science**, 245 (1989) p. 301-305.
75. Yonehara S. *Effects of anti-Fas antibodies on lymphocytes and other organs: preparation of original and new monoclonal antibodies and amelioration of systemic autoimmune disease*. **Int. Rev. Immunol.**, 18 (1999) p. 329-345.
76. Sträter J. and Möller P. *Expression and function of death receptors and their natural ligands in the intestine*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 915 (2000) p. 162-170.
77. Tanaka T., Mizuno K., Miyama M., Chang L., Chen H., Ohtaki S., Umesaki N. and Ogita S. *Enhanced Fas/CD95-mediated apoptosis by epidermal growth factor in human endometrial epithelial cells*. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, 86 (1999) p. 189-194.

78. Aoyama T., Takemura G., Maruyama R., Kosai K., Takahashi T., Koda M., Hayakawa K., Kawase Y., Minatoguchi S. and Fujiwara H. *Molecular mechanisms of non-apoptosis by Fas stimulation alone versus apoptosis with an additional actinomycin D in cultured cardiomyocytes.* **Cardiovasc. Res.**, 55 (2002) p. 787-798.
79. Lidington E.A., Moyes D.L., McCormack A.M. and Rose M.L. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. **Transpl. Immunol.**, 7 (1999) p. 239-246.
80. Cheema Z.F., Wade S.B., Sata M., Walsh K., Sohrabji F. and Miranda R.C. Fas/Apo [apoptosis]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex: induction of caspase-dependent cell death and activation of NF-kappaB. **J. Neurosci. Res.**, 19 (1999) p. 1754-70.
81. Le Deist F., Emile J.F., Rieux-Laucat F., Benkerrou M., Roberts I., Brousse N. and Fischer A. *Clinical, immunological, and pathological consequences of Fas-deficient conditions.* **Lancet**, 348 (1996) p. 719-723.
82. Duval R., Delebassée S., Cardot P.J.P. and Bosgiraud C. *Visna virus-induced cytopathic effect in vitro is caused by apoptosis.* **Arch. Virol.**, 147 (2002) p. 943-959.
83. Jeremias I., Herr I., Boehler T. and Debatin K.M. *TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells.* **Eur. J. Immunol.**, 28 (1998) p. 143-152.
84. Bobe P. *The Fas-Fas Ligand apoptotic pathway.* **Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Hemmatol.** (2002) p.
85. Müschen M., Warskulat U. and MW. B. *Defining CD95 as a tumor suppressor gene.* **J. Mol. Med.**, 78 (2000) p. 312-325.
86. Müllauer L., Gruber P., Sebinger D., Buch J., Wohlfart S. and Chott A. *Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease.* **Mutat. Res.**, 488 (2001) p. 211-231.
87. Willis T.G., Jadayel D.M., Du M.Q., Peng H., Perry A.R., Abdul-Rauf M., Price H., Karran L., Majekodunmi O., Wlodarska I., Pan L., Crook T., Hamoudi R., Isaacson P.G. and Dyer M.J. *Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types.* **Cell**, 96 (1999) p. 35-45.
88. Landowski T.H., Qu N., Buyuksal I., Painter J.S. and Dalton W.S. *Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma.* **Blood**, 90 (1997) p. 4266-4270.
89. Grønbaek K., Straten P.T., Ralfkiaer E., Ahrenkiel V., Andersen M.K., Hansen N.E., Zeuthen J., Hou-Jensen K. and Guldberg P. *Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity.* **Blood**, 92 (1998) p. 3018-3024.

90. Whiteside T.L. Apoptosis of immune cells in the tumor microenvironment and peripheral circulation of patients with cancer: implications for immunotherapy. **Vaccine**, 20 (2002) p. 46-51.
91. Oppenheim R.W., Prevette D., Yin Q.W., Collins F. and MacDonald J. *Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor*. **Science**, 251 (1991) p. 1616-1618.
92. De la Monte S.M., Sohn Y.K. and Wands J.R. *Correlates of p53- and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's disease*. **J. Neurol. Sci.**, 152 (1997) p. 73-83.
93. Honig L.S. and Rosenberg R.N. *Apoptosis and neurologic disease*. **Am. J. Med.**, 108 (2000) p. 317-330.
94. Sakurai H., Saburi Y., Matsubara K., Yokouchi K., Hattori K., Tsukamoto H. and Hayashi K. *A Pitfall in the Diagnosis of Left Main Coronary Obstruction Due to Aortic Dissection*. **J. Invasive Cardiol.**, 10 (1998) p. 454-456.
95. Rensing-Ehl A., Malipiero U., Irmeler M., Tschopp J., Constam D. and Fontana A. Neurons induced to express major histocompatibility complex class I antigen are killed via the perforin and not the Fas (APO-1/CD95) pathway. **Eur. J. Immunol.**, 26 (1996) p. 2271-2274.
96. Raoul C., Henderson C.E. and Pettmann B. Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor. **J. Cell Biol.**, 147 (1999) p. 1049-1062.
97. Yi F.H., Lautrette C., Vermot-Desroches C., Bordessoule D., Couratier P., Wijdenes J., Preud'homme J.L. and Jauberteau M.O. *In vitro induction of neuronal apoptosis by anti-Fas antibody-containing sera from amyotrophic lateral sclerosis patients*. **J. Neuroimmunol.**, 109 (2000) p. 211-220.
98. Park C., Sakamaki K., Tachibana O., Yamashita T., Yamashita J. and Yonehara S. *Expression of fas antigen in the normal mouse brain*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 252 (1998) p. 623-628.
99. Becher B., D'Souza S.D., Troutt A.B. and Antel J.P. Fas expression on human fetal astrocytes without susceptibility to fas-mediated cytotoxicity. **Neuroscience**, 84 (1998) p. 627-634.
100. Sakic B., Szechtman H., Denburg J.A., Gorny G., Kolb B. and Whishaw I.Q. *Progressive atrophy of pyramidal neuron dendrites in autoimmune MRL-lpr mice*. **J. Neuroimmunol.**, 87 (1998) p. 162-170.
101. Zuliani G., Ranzini M., Guerra G., Rossi L., Munari M.R., Zurlo A., Volpato S., Atti A.R., Blè A. and Fellin R. *Plasma cytokines profile in older subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia*. **J. Psychiatr. Res.**, 41 (2007) p. 686-693.

102. Banelli B., Gelv i.I., Di Vinci A., Scaruffi P., Casciano I., Allemanni G., Bonassi S., Tonini G.P. and Romani M. *Distinct CpG methylation profiles characterize different clinical groups of neuroblastic tumors.* **Oncogene.**, 24 (2005) p. 5619-5928.
103. Lázcoz P., Muñoz J., Nistal M., Pestaña A., Encío I. and Castresana J.S. *Frequent promoter hypermethylation of RASSF1A and CASP8 in neuroblastoma.* **BMC Cancer**, 25 (2006) p. 254.
104. Kim S., Kang J., Evers B.M. and Chung D.H. Interferon-gamma induces caspase-8 in neuroblastomas without affecting methylation of caspase-8 promoter. **J. Pediatr. Surg.**, 39 (2004) p. 509-515.
105. Rastetter M., Schagdarsurengin U., Lahtz C., Fiedler E., Marsch W.C., Dammann R. and Helmbold P. *Frequent intra-tumoural heterogeneity of promoter hypermethylation in malignant melanoma.* **Histol. Histopathol.**, 22 (2007) p. 1005-1015.
106. Micheau O., Solary E., Hammann A., Martin F. and Dimanche-Boitrel M.T. *Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity.* **J. Natl. Cancer Inst.**, 89 (1997) p. 783-789.
107. Uslu R., Borsellino N., Frost P., Gárban H., Ng C.P., Mizutani Y., Beldegrun A. and Bonavida B. *Chemosensitization of human prostate carcinoma cell lines to anti-fas-mediated cytotoxicity and apoptosis.* **Clin. Cancer Res.**, 3 (1997) p. 963-972.
108. Wu J., Fei P., Gong Y., Zhao J., Dong J. and Tang F. *Apoptosis and related gene expression in lacrimal gland of cases with Sjögren's syndrome.* **Zhonghua Yan Ke Za Zhi**, 36 (2000) p. 255-258.
109. Krammer P.H., Galle P.R., Möller P. and Debatin K.M. *CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis in normal and malignant liver, colon, and hematopoietic cells.* **Adv. Cancer Res.**, 75 (1998) p. 251-273.
110. Muller M.B. and Frimmel F.H. A new concept for the fractionation of DOM as a basis for its combined chemical and biological characterization. **Water Research**, 36 (2002) p. 2643-2655.
111. Friesen C., Fulda S. and Debatin K.M. Induction of CD95 ligand and apoptosis by doxorubicin is modulated by the redox state in chemosensitive- and drug-resistant tumor cells. **Cell Death Differ.**, 6 (1999) p. 471-480.
112. Day T.W., Najafi F., Wu C.H. and Safa A.R. *Cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP): a novel target for Taxol-induced apoptosis.* **Biochem. Pharmacol.**, 71 (2006) p. 1551-1561.

- 113.Rensing-Ehl A., Frei K., Flury R., Matiba B., Mariani S.M., Weller M., Aebischer P., Krammer P.H. and Fontana A. *Local Fas/APO-1 (CD95) ligand-mediated tumor cell killing in vivo*. **Eur. J. Immunol.**, 25 (1995) p. 2253-2258.
- 114.Philip M., Rowley D.A. and Schreiber H. *Inflammation as a tumor promoter in cancer induction*. **Semin. Cancer Biol.**, 14 (2004) p. 433-439.
- 115.Ogasawara J., Watanabe-Fukunaga R., Adachi M., Matsuzawa A., Kasugai T., Kitamura Y., Itoh N., Suda T. and Nagata S. *Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice*. **Nature**, 364 (1993) p. 806-809.
- 116.Tanaka M., Suda T., Yatomi T., Nakamura N. and Nagata S. *Lethal effect of recombinant human Fas ligand in mice pretreated with Propionibacterium acnes*. **J. Immunol.**, 158 (1997) p. 2303-2309.
- 117.Timmer T., De Vries E.G. and De Jong S. *Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application?* **J. Pathol.**, 196 (2002) p. 125-134.
- 118.Saikumar P., Dong Z., Mikhailov V., Denton M., Weinberg J.M. and Venkatachalam M.A. *Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease*. **Am. J. Med.**, 107 (1999) p. 489-506.
- 119.Thompson C.B. *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. **Science**, 267 (1995) p. 1456-1462.
- 120.Hansen M.F., Seton M. and Merchant A. *Osteosarcoma in Paget's disease of bone*. **J. Bone Miner. Res.**, 21 (2006) p. 58-63.
- 121.Lodwick G.S., Wilson A.J., Farrell C., Virtama P., Smeltzer F.M. and Dittrich F. *Estimating rate of growth in bone lesions: observer performance and error*. **Radiology**, 134 (1980) p. 585-590.
- 122.Suresh S. and Saifuddin A. *Radiological appearances of appendicular osteosarcoma: a comprehensive pictorial review*. **Clin. Radiol.**, 62 (2007) p. 314-323.
- 123.Hristov B., Shokek O. and Frassica D.A. *The role of radiation treatment in the contemporary management of bone tumors*. **J. Natl. Compr. Canc. Netw.**, 5 (2007) p. 456-466.
- 124.Kazmi S.A., Perry A., Pressey J.G., Wellons J.C., Hammers Y. and Palmer C.A. *Primary Ewing sarcoma of the brain: a case report and literature review*. **Diagn. Mol. Pathol.**, 16 (2007) p. 108-11.
- 125.Klein M.J. and Siegal G.P. *Osteosarcoma: anatomic and histologic variants*. **Am. J. Clin. Pathol.**, 125 (2006) p. 555-581.
- 126.Schuetze S.M. *Chemotherapy in the management of osteosarcoma and Ewing's sarcoma*. **J. Natl. Compr. Canc. Netw.**, 5 (2007) p. 449-455.

127. Brenner W., Bohuslavizki K.H. and Eary J.F. *PET imaging of osteosarcoma*. **J. Nucl. Med.**, 45 (2004) p. 930-942.
128. Smith J., Heelan R.T. and Huvos A.G. Radiologic changes in primary osteogenic sarcomas following intensive chemotherapy. **Radiology**, (1982) p. 355-360.
129. Moalic S., Liagre B., Corbiere C., Bianchi A., Dauca M., Bordji K. and Beneytout J.L. *A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells*. **FEBS Lett.**, 506 (2001) p. 225-230.
130. Corbière C., Battu S., Liagre B., Cardot P.J.P. and Beneytout J.L. SdFFF monitoring of cellular apoptosis induction by diosgenin and different inducers in the human 1547 osteosarcoma cell line. **J. Chromatogr. B.**, 808 (2004) p. 255-262.
131. Corbiere C., Liagre B., Bianchi A., Bordji K., Dauca M., Netter P. and Beneytout J.L. Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. **Int. J. Oncol.**, 22 (2003) p. 899-905.
132. Mujoo K., Haridas V., Hoffmann J.J., Wachter G.A., Hutter L.K., Lu Y., Blake M.E., Jayatilake G.S., Bailey D., Mills G.B. and Gutterman J.U. *Triterpenoid saponins from Acacia victoriae (Benth) decrease tumor cell proliferation and induce apoptosis*. **Cancer Res.**, 61 (2001) p. 5486-5490.
133. Haridas V., Higuchi M., Jayatilake G.S., Bailey D., Mujoo K., Blake M.E., Arntzen C.J. and Gutterman J.U. *Avicins: triterpenoid saponins from Acacia victoriae (Benth) induce apoptosis by mitochondrial perturbation*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 98 (2001) p. 5821-5826.
134. Higdon K., Scott A., Tucci M., Benghuzzi H., Tsao A., Puckett A., Cason Z. and Hughes J. The use of estrogen, DHEA, and diosgenin in a sustained delivery setting as a novel treatment approach for osteoporosis in the ovariectomized adult rat model. **Biomed. Sci. Instrum.**, 37 (2001) p. 281-286.
135. Kim S.E., Lee Y.H., Park J.H. and Lee S.K. Ginsenoside-Rs4, a new type of ginseng saponin concurrently induces apoptosis and selectively elevates protein levels of p53 and p21WAF1 in human hepatoma SK-HEP-1 cells. **Eur. J. Cancer.**, 35 (1999) p. 507-511.
136. Lee J.Y., Shin J.W., Chun K.S., Park K.K., Chung W.Y., Bang Y.J., Sung J.H. and Surh Y.J. Antitumor promotional effects of a novel intestinal bacterial metabolite (IH-901) derived from the protopanaxadiol-type ginsenosides in mouse skin. **Carcinogenesis**, 26 (2005) p. 359-367.
137. Singh S.V., Zeng Y., Xiao D., Vogel V.G., Nelson J.B., Dhir R. and Tripathi Y.B. Caspase-dependent apoptosis induction by guggulsterone, a constituent of Ayurvedic medicinal

plant *Commiphora mukul*, in PC-3 human prostate cancer cells is mediated by Bax and Bak. **Mol. Cancer Ther.**, 4 (2005) p. 1747-1754.

138. Shishodia S. and Aggarwal B.B. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates activation of cigarette smoke-induced nuclear factor (NF)-kappaB by suppressing activation of IkappaBalpha kinase in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of cyclin D1, COX-2, and matrix metalloproteinase-9. **Cancer Res.**, 64 (2004) p. 5004-5012.

139. Nervi F., Marinovic I., Rigotti A. and Ulloa N. Regulation of biliary cholesterol secretion. Functional relationship between the canalicular and sinusoidal cholesterol secretory pathways in the rat. **J. Clin. Invest.**, 82 (1988) p. 1818-1825.

140. Benghuzzi H., Tucci M., Eckie R. and Hughes J. *The effects of sustained delivery of diosgenin on the adrenal gland of female rats.* **Biomed. Sci. Instrum.**, 39 (2003) p. 335-340.

141. Shishodia S. and Aggarwal B.B. Diosgenin inhibits osteoclastogenesis, invasion, and proliferation through the downregulation of Akt, I kappa B kinase activation and NF-kappa B-regulated gene expression. **Oncogene**, 25 (2006) p. 1463-1473.

142. Yen M.L., Su J.L., Chien C.L., Tseng K.W., Yang C.Y., Chen W.F., Chang C.C. and Kuo M.L. Diosgenin induces hypoxia-inducible factor-1 activation and angiogenesis through estrogen receptor-related phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts. **Mol. Pharmacol.**, 68 (2005) p. 1061-1073.

143. Beneytout J.L., Nappéz C., Leboutet M.J. and Malinvaud G. *A plant steroid, diosgenin, a new megakaryocytic differentiation inducer of HEL cells.* **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 207 (1995) p. 398-404.

144. Corbière C., Liagre B., Terro F. and Beneytout J.L. Induction of antiproliferative effect by diosgenin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (AIF) and modulation of caspase-3 activity in different human cancer cells. **Cell Res.**, 14 (2004) p. 188-196.

145. Liagre B., Bertrand J., Leger D.Y. and Beneytout J.L. Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in COX-2 deficient K562 cells with activation of the p38 MAP kinase signalling and inhibition of NF-kappaB binding. **Int. J. Mol. Med.**, 16 (2005) p. 1095-1101.

146. Liagre B., Leger D.Y., Vergne-Salle P. and Beneytout J.L. MAP kinase subtypes and Akt regulate diosgenin-induced apoptosis of rheumatoid synovial cells in association with COX-2 expression and prostanoid production. **Int. J. Mol. Med.**, 19 (2007) p. 113-122.

147. Raju J., Patlolla J.M., Swamy M.V. and Rao C.V. Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci

formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, 13 (2004) p. 1392-1398.

148.Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I. and Smith A. *Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4.* **Cell**, 95 (1998) p. 379-391.

149.Leszczyniecka M., Roberts T., Dent P., Grant S. and Fisher P.B. *Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications.* **Pharmacol. Ther.**, 90 (2001) p. 105-156.

150.Brodeur G.M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. **Nat. Rev. Cancer**, 3 (2003) p. 203-216.

151.Haas D., Ablin A.R., Miller C., Zoger S. and Matthay K.K. *Complete pathologic maturation and regression of stage IVS neuroblastoma without treatment.* **Cancer**, 62 (1988) p. 818-825.

152.Evans A.E., D'Angio G.J., Propert K., Anderson J. and Hann H.W. *Prognostic factor in neuroblastoma.* **Cancer**, 59 (1999) p. 1853-1859.

153.Shimada H., Ambros I.M., Dehner L.P., Hata J., Joshi V.V., Roald B., Stram D.O., Gerbing R.B., Lukens J.N., Matthay K.K. and Castleberry R.P. *The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system).* **Cancer**, 86 (1999) p. 364-372.

154.Maris J.M. and Matthay K.K. *Molecular biology of neuroblastoma.* **J. Clin. Oncol.**, 17 (1999) p. 2264-2279.

155.Joshi V.V., Chatten J., Sather H.N. and Shimada H. Evaluation of the Shimada classification in advanced neuroblastoma with a special reference to the mitosis-karyorrhexis index: a report from the Childrens Cancer Study Group. **Mod. Pathol.**, 4 (1991) p. 139-147.

156.van Noesel M.M. and Versteeg R. Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic 'danse macabre'. **Gene**, 325 (2004) p. 1-15.

157.Bown N. Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. **J Clin Pathol**, 54 (2001) p. 897-910.

158.Morgenstern B.Z., Krivoshik A.P., Rodriguez V. and Anderson P.M. *Wilms' tumor and neuroblastoma.* **Acta Paediatr Suppl**, 93 (2004) p. 78-84; discussion 84-5.

159.Beierwaltes W.H. *The history of the use of radioactive iodine.* **Semin. Nucl. Med.**, 9 (1979) p. 151-155.

160.Beierwaltes W.H. Treatment of neuroblastoma with ¹³¹I-MIBG: dosimetric problems and perspectives. **Med. Pediatr. Oncol.**, 15 (1987) p. 188-191.

161. Nakajo M., Shapiro B., Copp J., Kalff V., Gross M.D., Sisson J.C. and Beierwaltes W.H. The normal and abnormal distribution of the adrenomedullary imaging agent m-[I-131]iodobenzylguanidine (I-131 MIBG) in man: evaluation by scintigraphy. **J. Nucl. Med.**, 24 (1983) p. 672-682.
162. Bonnin F., Lumbroso J., Tenenbaum F., Hartmann O. and Parmentier C. *Refining interpretation of MIBG scans in children.* **J. Nucl. Med.**, 35 (1994) p. 803-810.
163. Lumbroso J.D., Guermazi F., Hartmann O., Coornaert S., Rabarison Y., Leclere J.G., Couanet D., Bayle C., Caillaud J.M., Lemerle J. and al. e. *Meta-iodobenzylguanidine (mIBG) scans in neuroblastoma: sensitivity and specificity, a review of 115 scans.* **Prog. Clin. Biol. Res.**, 271 (1988) p. 689-705.
164. Perel Y., Conway J., Kletzel M., Goldman J., Weiss S., Feyler A. and Cohn S.L. *Clinical impact and prognostic value of metaiodobenzylguanidine imaging in children with metastatic neuroblastoma.* **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, 21 (1999) p. 13-18.
165. Haase G.M., Atkinson J.B., D.O. S., Lukens J.N. and Matthay K.K. Surgical management and outcome of locoregional neuroblastoma: comparison of the Childrens Cancer Group and the international staging systems. **J. Pediatr. Surg.**, 30 (1995) p. 289-294.
166. Castleberry R.P., Shuster J.J. and Smith E.I. The Pediatric Oncology Group experience with the international staging system criteria for neuroblastoma. Member Institutions of the Pediatric Oncology Group. **J. Clin. Oncol.**, 12 (1994) p. 2378-2381.
167. Brodeur G.M., Pritchard J., Berthold F., Carlsen N.L., Castel V., Castleberry R.P., De Bernardi B., Evans A.E., Favrot M. and Hedborg F. *Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment.* **J. Clin. Oncol.**, 11 (1993) p. 1466-1477.
168. Evans A.E., D'Angio G.J. and Randolph J. A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's cancer study group A. **Cancer**, 27 (1971) p. 374-378.
169. Look A.T., Hayes F.A., Shuster J.J., Douglass E.C., Castleberry R.P., Bowman L.C., Smith E.I. and Brodeur G.M. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. **J. Clin. Oncol.**, 9 (1991) p. 581-591.
170. Shimada H., Stram D.O., Chatten J., Joshi V.V., Hachitanda Y., Brodeur G.M., Lukens J.N., Matthay K.K. and Seeger R.C. *Identification of subsets of neuroblastomas by combined histopathologic and N-myc analysis.* **J. Natl. Cancer. Inst.**, 87 (1995) p. 1470-1476.

171.Gansler T., Chatten J., Varello M., Bunin G.R. and Atkinson B. *Flow cytometric DNA analysis of neuroblastoma. Correlation with histology and clinical outcome. Cancer*, 58 (1986) p. 2453-2458.

172.Bown N., Cotterill S., Lastowska M., O'Neill S., Pearson A.D., Plantaz D., Meddeb M., Danglot G., Brinkschmidt C., Christiansen H., Laureys G., Speleman F., Nicholson J., Bernheim A., Betts D.R., Vandesompele J. and Van Roy N. *Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. N. Engl. J. Med.*, 340 (1999) p. 1992-1993.

173.Vandesompele J., Baudis M., De Preter K., Van Roy N., Ambros P., Bown N., Brinkschmidt C., Christiansen H., Combaret V., Lastowska M., Nicholson J., O'Meara A., Plantaz D., Stallings R., Brichard B., Van den Broecke C., De Bie S., De Paepe A.L., G. and Speleman F. *Unequivocal delineation of clinicogenetic subgroups and development of a new model for improved outcome prediction in neuroblastoma. J. Clin. Oncol.*, 23 (2005) p. 2280-2299.

174.Le Douarin N.M. The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: a long and still ongoing story. *Mech. Dev.*, 121 (2004) p. 1081-1102.

175.Nakagawara A., Arima-Nakagawara M., Scavarda N.J., Azar C.G., Cantor A.B. and Brodeur G.M. *Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. N. Engl. J. Med.*, 328 (1993) p.

176.Lastowska M., Cullinane C., Variend S., Cotterill S., Bown N., O'Neill S., Mazzocco K., Roberts P., Nicholson J., Ellershaw C., Pearson A.D. and Jackson M.S. *Comprehensive genetic and histopathologic study reveals three types of neuroblastoma tumors. J. Clin. Oncol.*, 19 (2001) p. 3080-3090.

177.Matthay K.K., Villablanca J.G., Seeger R.C., Stram D.O., Harris R.E., Ramsay N.K., Swift P., Shimada H., Black C.T., Brodeur G.M., Gerbing R.B. and Reynolds C.P. *Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. N. Engl. J. Med.*, 341 (1999) p. 1165-1173.

178.Perez C.A., Matthay K.K., Atkinson J.B., Seeger R.C., Shimada H., Haase G.M., Stram D.O., Gerbing R.B. and Lukens J.N. *Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy : A Children's Cancer Group study. J. Clin. Oncol.*, 18 (2000) p. 18-26.

179.Harris A.L. and Hochhauser D. *Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment. Acta Oncol.*, 31 (1992) p. 205-213.

180.Sachs L. The differentiation of myeloid leukaemia cells: new possibilities for therapy. *Br. J. Haematol.*, 40 (1978) p. 509-517.

181. Tsiftoglou A.S., Pappas I.S. and Vizirianakis I.S. *Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells.* **Pharmacol. Ther.**, 100 (2003) p. 257-290.
182. Sidell N., Altman A., Haussler M.R. and Seeger R.C. Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. **Exp. Cell Res.**, 148 (1983) p. 21-30.
183. Ponzoni M., Bocca P., Chiesa V., Decensi A., Pistoia V., Raffaghello L., Rozzo C. and Montaldo P.G. Differential effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and retinoic acid on neuroblastoma cells: apoptosis versus differentiation. **Cancer Res.**, 55 (1995) p. 853-861.
184. Barbacid M. *Neurotrophic factors and their receptors.* **Curr. Opin. Cell Biol.**, 7 (1995) p. 148-155.
185. Lavenius E., Gestblom C., Johansson I., Nånberg E. and Pålman S. Transfection of TRK-A into human neuroblastoma cells restores their ability to differentiate in response to nerve growth factor. **Cell Growth Differ.**, 6 (1995) p. 727-736.
186. Nakagawara A., Azar C.G., Scavarda N.J. and Brodeur G.M. *Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas.* **Mol. Cell. Biol.**, 14 (1994) p. 759-767.
187. Thiele C.J., Reynolds C.P. and Israel M.A. Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. **Nature**, 313 (1985) p. 404-406.
188. Cheung B., Hocker J.E., Smith S.A., Norris M.D., Haber M. and Marshall G.M. Favorable prognostic significance of high-level retinoic acid receptor beta expression in neuroblastoma mediated by effects on cell cycle regulation. **Oncogene**, 17 (1998) p. 751-759.
189. Meister B., Fink F.M., Hittmair A., Marth C. and Widschwendter M. Antiproliferative activity and apoptosis induced by retinoic acid receptor-gamma selectively binding retinoids in neuroblastoma. **Anticancer Res.**, 18 (1998) p. 1777-1786.
190. Di Vinci A., Geido E., Infusini E. and Giaretti W. *Neuroblastoma cell apoptosis induced by the synthetic retinoid N-(4-hydroxyphenyl)retinamide.* **Int. J. Cancer.**, 59 (1994) p. 422-426.
191. Lin M.S., Chen W.C., Bai X. and Wang Y.D. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits cell growth via apoptosis and arrest of the cell cycle in human colorectal cancer. **J. Dig. Dis.**, 8 (2007) p. 82-88.
192. Cellai I., Benvenuti S., Luciani P., Galli A., Ceni E., Simi L., Baglioni S., Muratori M., Ottanelli B., Serio M., Thiele C.J. and Peri A. *Antineoplastic effects of rosiglitazone and PPARgamma transactivation in neuroblastoma cells.* **Br. J. Cancer**, 95 (2006) p. 879-888.

193. Jung T.W., Lee J.Y., Shim W.S., Kang E.S., Kim S.K., Ahn C.W., Lee H.C. and Cha B.S. *Rosiglitazone protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against acetaldehyde-induced cytotoxicity*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 340 (2006) p. 221-227.
194. Cellai I., Benvenuti S., Luciani P. and Galli A C.E., Simi L, Baglioni S, Muratori M, Ottanelli B, Serio M, Thiele CJ, Peri A. *Antineoplastic effects of rosiglitazone and PPARgamma transactivation in neuroblastoma cells*. **Br. J. Cancer.**, 95 (2006) p. 879-888.
195. Ross R.T. and Schoemperlen C.B. The effect of aminopterin and partial exsanguination transfusion on a case of acute stem cell leukemia; a case report and review of the literature on these two procedures. **Ann. Intern. Med.**, 32 (1950) p. 123-128.
196. Dontu G., Al-Hajj M., Abdallah W.M., Clarke M.F. and Wicha M.S. *Stem cells in normal breast development and breast cancer*. **Cell Prolif.**, 36 (2003) p. 59-72.
197. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J. and Clarke M.F. *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, 100 (2003) p. 3983-3988.
198. Ponti D., Zaffaroni N., Capelli C. and Daidone M.G. *Breast cancer stem cells: an overview*. **Eur. J. Cancer.**, 42 (2006) p. 1219-1224.
199. Ponti D., Costa A., Zaffaroni N., Pratesi G., Petrangolini G., Coradini D., Pilotti S., Pierotti M.A. and Daidone M.G. *Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties*. **Cancer Res.**, 65 (2005) p. 5506-5511.
200. Fillmore C. and Kuperwasser C. Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man? **Breast Cancer Res.**, 9 (2007) p. 303.
201. van Rhenen A., Moshaver B., Kelder A., Feller N., Nieuwint A.W., Zweegman S., Ossenkoppele G.J. and Schuurhuis G.J. Aberrant marker expression patterns on the CD34+CD38- stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission. **Leukemia**, (2007) p.
202. Singh S. and Dirks P.B. *Brain tumor stem cells: identification and concepts*. **Neurosurg. Clin. N. Am.**, 18 (2007) p. 31-38.
203. Piccirillo S.G., Reynolds B.A., Zanetti N., Lamorte G., Binda E., Broggi G., Brem H., Olivi A., Dimeco F. and Vescovi A.L. *Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells*. **Nature**, 444 (2006) p. 761-765.
204. Assidjo E. and Cardot P.J.P. Sedimentation field-flow fractionation at gravitational field of red blood cells: systematic studies of injection conditions. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, 20 (1997) p. 2579-2597.

205. Cardot P.J.P., Launay J.-M. and Martin M. *Age-dependent elution of human red blood cells in gravitational field-flow fractionation.* **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, 20 (1997) p. 2543-2553.
206. Merino-Dugay A., Cardot P.J.P., Czok M., Guernet M. and Andreux J.P. *Monitoring of an experimental red blood cell pathology with gravitational field-flow fractionation.* **J. Chromatogr.**, 579 (1992) p. 73-83.
207. Parsons R., Yue V., Tong X., Cardot P., Bernard A., Andreux J.P. and Caldwell K. *Comparative study of human red blood cell analysis with three different field-flow fractionation systems.* **J. Chromatogr. B**, 686 (1996) p. 177-187.
208. Urbankova E., Vacek A. and Chmelik J. *Micropreparation of hemopoietic stem cells from the mouse bone marrow suspension by gravitational field-flow fractionation.* **J. Chromatogr. B**, 687 (1996) p. 449-452.
209. Metreau J.M., Gallet S., Cardot P.J., Le Maire V., Dumas F., Hervann A. and Loric S. *Sedimentation field-flow fractionation of cellular species.* **Anal. Biochem.**, 251 (1997) p. 178-186.
210. Tong X. and Caldwell K.D. *Differential swelling kinetics in particle separation by steric FFF: Simulation and experiment.* **Book of Abstracts, 214th ACS National Meeting, Las Vegas, NV, September 7-11, (1997)** p. ANYL-125.
211. Battu S., Elyaman W., Hugon J. and Cardot P.J.P. *Cortical cell elution by sedimentation field-flow fractionation.* **Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.**, 1528 (2001) p. 89-96.
212. Guglielmi L., Battu S., Le Bert M., Faucher J.L., Cardot P.J.P. and Denizot Y. *Mouse embryonic stem cell sorting for the generation of transgenic mice by sedimentation field-flow fractionation.* **Anal. Chem.**, 76 (2004) p. 1580-1585.
213. Leger D.Y., Liagre B., Cardot P.J.P., Beneytout J.L. and Battu S. *Diosgenin dose-dependent apoptosis and differentiation induction in HEL cell line and SdFFF monitoring.* **Anal. Biochem.**, 335 (2004) p. 267-278.
214. Weers J.G. and Arlauskas R.A. *Particle size analysis of perfluorocarbon emulsions in a complex whole blood matrix by sedimentation field-flow fractionation.* **Colloid Surface B**, 33 (2004) p. 265-269.
215. Arifin D.R. and Palmer A.F. *Stability of liposome encapsulated hemoglobin dispersions.* **Artif. Cell Blood Sub. Biotechnol.**, 33 (2005) p. 113-136.
216. Comte I., Battu S., Mathonnet M., Bessette B., Lalloue F., Cardot P. and Ayer-Le Lievre C. *Neural stem cell separation from the embryonic avian olfactory epithelium by sedimentation field-flow fractionation.* **J. Chromatogr. B**, 843 (2006) p. 175-182.

- 217.Liu J., Andya J.D. and Shire S.J. A critical review of analytical ultracentrifugation and field flow fractionation methods for measuring protein aggregation. **AAPS J.**, 8 (2006) p. E580-E589.
- 218.Farmakis L. and Koliadima A. Kinetic Study of Cell Proliferation of *Saccharomyces cerevisiae* Strains by Sedimentation/Steric Field Flow Fractionation in Situ. **Biotechnol. Prog.**, 21 (2005) p. 971-977.
- 219.Saenton S., Lee H., Gao Y.-S., Ranville J.F. and Williams S.K.R. *Evaluation of different field-flow fractionation techniques for separating bacteria.* **Sep. Sci. Technol.**, 35 (2000) p. 1761-1775.
- 220.Khoshmanesh A., Sharma R. and Beckett R. *Biomass of sediment bacteria by sedimentation field-flow fractionation.* **J. Environ. Eng.**, 127 (2001) p. 19-25.
- 221.Leger D.Y., Battu S., Liagre B., Cardot P.J.P. and Beneytout J.L. Sedimentation field flow fractionation to study human erythroleukemia cell megakaryocytic differentiation after short period diosgenin induction. **J. Chromatogr. A**, 1157 (2007) p. 309-320.
- 222.Bégaud-Grimaud G., Battu S., Lazcoz P., Castresana J.S., Jauberteau M.O. and Cardot P.J.P. *Study of the phenotypic relationship in the IMR-32 human neuroblastoma cell line by sedimentation field flow fractionation.* **Int. J. Cancer**, in press (2007) p.
- 223.Yang J., Huang Y., Wang X.B., Becker F.F. and Gascoyne P.R. *Differential analysis of human leukocytes by dielectrophoretic field-flow-fractionation.* **Biophys. J.**, 78 (2000) p. 2680-2689.
- 224.Wang X.-B., Yang J., Huang Y., Vykoukal J., Becker F.F. and Gascoyne P.R.C. *Cell Separation by Dielectrophoretic Field-flow-fractionation.* **Anal. Chem.**, 72 (2000) p. 832-839.
- 225.Cardot P.J.P., Chianea T. and Battu S., *Sedimentation Field Flow Fractionation of Living Cells*, in *Encyclopedia of chromatography*, Cazes, J., Editor. 2001, M. Dekker Inc.: New York. p. 742-747.
- 226.Pethig R., Lee R.S. and Talary M.S. *Cell physiometry tools based on dielectrophoresis.* **J Association for Laboratory Automation**, 9 (2004) p. 324-330.
- 227.Mattanovich D. and Borth N. *Applications of cell sorting in biotechnology.* **Microb. Cell Fact.**, 5 (2006) p.
- 228.Radisic M., Lyer R.K. and Murthy S.K. *Micro- and nanotechnology in cell separation.* **Int. J. Nanomedicine**, 1 (2006) p. 3-14.
- 229.Bauer J. *Advances in cell separation: recent developments in counterflow centrifugal elutriation and continuous flow cell separation.* **J. Chromatogr. B.**, 722 (1999) p. 55-69.

- 230.Liu B.-F., Xu B., Zhang G., Du W. and Luo Q. *Micro-separation toward systems biology*. **J. Chromatogr. A**, 1106 (2006) p. 19-28.
- 231.McClain M.A., Culbertson C.T., Jacobson S.C., Allbritton N.L., Sims C.E. and Ramsey J.M. *Microfluidic Devices for the High-Throughput Chemical Analysis of Cells*. **Anal. Chem.**, 75 (2003) p. 5646-5655.
- 232.Chalmers J.J., Zborowski M., Sun L. and Moore L. *Flow Through, Immunomagnetic Cell Separation*. **Biotechnol. Prog.**, 14 (1998) p. 141-148.
- 233.Wang X.B., Yang J., Huang Y., Vykoukal J., Becker F.F. and Gascoyne P.R. *Cell separation by dielectrophoretic field-flow-fractionation*. **Anal. Chem.**, 72 (2000) p. 832-839.
- 234.Zborowski M. and Chalmers J.J. *Magnetic cell sorting*. **Methods Mol Biol.**, 295 (2005) p. 291-300.
- 235.Smith J.E., Wang L. and Tan W. Bioconjugated silica-coated nanoparticles for bioseparation and bioanalysis. **TrAC**, 25 (2006) p. 848-855.
- 236.Tong X., Yang L., Lang J.C., Zborowski M. and Chalmers J.J. Application of immunomagnetic cell enrichment in combination with RT-PCR for the detection of rare circulating head and neck tumor cells in human peripheral blood. **Cytom. B Clin. Cytom.**, Epub ahead of print (2007) p.
- 237.Caldwell K.D., Kesner L.F., Myers M.N. and Giddings J.C. *Electrical field-flow fractionation of proteins*. **Science**, 176 (1972) p. 296-298.
- 238.Dunkel M., Tri N., Beckett R. and Caldwell K.D. Electrical field-flow fractionation: a tool for characterization of colloidal adsorption complexes. **J. Microcolumn Sep.**, 9 (1997) p. 177-183.
- 239.Gale B.K., Caldwell K.D. and Frazier A.B. *A micromachined electrical field-flow fractionation (μ -EFFF) system*. **IEEE T. Bio-Med. Eng.**, 45 (1998) p. 1459-69.
- 240.Gale B.K., Caldwell K. and Frazier A.B. *Blood and protein separations using a micromachined electrical field-flow fractionation (μ -EFFF) system*. **Micro Total Analysis Systems 2000, Proceedings of the μ .TAS Symposium, 4th, Enschede, Netherlands, May 14-18, 2000**, (2000) p. 399-402.
- 241.Gale B.K., Caldwell K.D. and Frazier A.B. Geometric Scaling Effects in Electrical Field Flow Fractionation. 1. Theoretical Analysis. **Anal. Chem.**, 73 (2001) p. 2345-2352.
- 242.Gale B.K., Caldwell K.D. and Frazier A.B. Geometric Scaling Effects in Electrical Field Flow Fractionation. 2. Experimental Results. **Anal. Chem.**, 74 (2002) p. 1024-1030.

243. Gale B.K. *Novel techniques and instruments for field-flow fractionation of biological materials. Abstracts of Papers, 225th ACS National Meeting, New Orleans, LA, United States, March 23-27, 2003, (2003) p. ANYL-199.*
244. Williams S.K.R., Lee H. and Turner M.M. Size characterization of magnetic cell sorting microbeads using flow field-flow fractionation and photon correlation spectroscopy. **J. Magn. Magn. Mater.**, 194 (1999) p. 248-253.
245. Gascoyne P.C., Das C., Vykoukal J., Weinstein R., Gandini A., Parks D. and Sawh R. *Magnetophoretic-dielectrophoretic field-flow fractionation. Abstracts of Papers, 225th ACS National Meeting, New Orleans, LA, United States, March 23-27, 2003, (2003) p. ANYL-198.*
246. Latham A.H., Freitas R.S., Schiffer P. and Williams M.E. *Capillary magnetic field flow fractionation and analysis of magnetic nanoparticles. Abstracts of Papers, 230th ACS National Meeting, Washington, DC, United States, Aug. 28-Sept. 1, 2005, 77 (2005) p. 5055-5062.*
247. Carpino F., Moore L.R., Zborowski M., Chalmers J.J. and Williams P.S. *Analysis of magnetic nanoparticles using quadrupole magnetic field-flow fractionation. J. Magn. Magn. Mater.*, 293 (2005) p. 546-552.
248. Sant H.J. and Gale B.K. *Geometric scaling effects on instrumental plate height in field flow fractionation. J. Chromatogr. A*, 1104 (2006) p. 282-90. FIELD Reference Number: FIELD Journal Code:9318488 FIELD Call Number:.
249. Sant H.J., Kim J.W. and Gale B.K. Reduction of End Effect-Induced Zone Broadening in Field-Flow Fractionation Channels. **Anal. Chem.**, 78 (2006) p. 7978-7985.
250. Narayanan N., Saldanha A. and Gale B.K. *A microfabricated electrical SPLIT system. Lab on a Chip*, 6 (2006) p. 105-114.
251. Schallinger L.E., Yau W.W. and Kirkland J.J. *Sedimentation field flow fractionation of DNA's. Science (Washington, D. C., 1883-), 225 (1984) p. 434-7.*
252. Schallinger L.E., Gray J.E., Wagner L.W., Knowlton S. and Kirkland J.J. *Preparative isolation of plasmid DNA with sedimentation field flow fractionation. J. Chromatogr.*, 342 (1985) p. 67-77.
253. Liu M.K. and Giddings J.C. Separation and measurement of diffusion coefficients of linear and circular DNAs by flow field-flow fractionation. **Macromolecules**, 26 (1993) p. 3576-88.
254. Nilsson M., Wahlund K.-G. and Bulow L. Monitoring of ribosomes and subunits in *Escherichia coli* during production of glucose isomerase using flow field-flow fractionation. **Biotechnol. Tech.**, 12 (1998) p. 477-480.

- 255.Nilsson M., Kallio P.T., Bailey J.E., Buelow L. and Wahlund K.-G. Expression of Vitreoscilla Hemoglobin in Escherichia coli Enhances Ribosome and tRNA Levels: A Flow Field-Flow Fractionation Study. **Biotechnol. Prog.**, 15 (1999) p. 158-163.
- 256.Cole K.D., Tellez C.M. and Blakesley R.W. Separation of different physical forms of plasmid DNA using a combination of low electric field strength and flow in porous media: effect of different field gradients and porosity of the media. **Electrophoresis**, 21 (2000) p. 1010-1017.
- 257.Eaton M.A.W., Baker T.S., Catterall C.F., Crook K., Macaulay G.S., Mason B., Norman T.J., Parker D., Perry J.J.B., Taylor R.J., Turner A. and Weir A.N. A new self-assembling system for targeted gene delivery. **Angew. Chem., Int. Ed.**, 39 (2000) p. 4063-4067.
- 258.Lee H., Williams S.K.R., Allison S.D. and Anchordoquy T.J. Analysis of self-assembled cationic lipid-DNA gene carrier complexes using flow field-flow fractionation and light scattering. **Anal. Chem.**, 73 (2001) p. 837-843.
- 259.Arvidsson C. and Wahlund Karl G. Time-minimized determination of ribosome and tRNA levels in bacterial cells using flow field-flow fractionation. **Anal. Biochem.**, 313 (2003) p. 76-85.
- 260.Chen Z. and Chauhan A. DNA separation by EFFF in a microchannel. **J. Colloid Interface Sci.**, 285 (2005) p. 834-844.
- 261.Cotts P.M. and Zheng M. Light scattering of DNA-carbon nanotubes in aqueous suspension. **Abstracts of Papers, 230th ACS National Meeting, Washington, DC, United States, Aug. 28-Sept. 1, 2005**, (2005) p. PMSE-027.
- 262.Lao A.I.K. and Hsing I.M. Flow-based and sieving matrix-free DNA differentiation by a miniaturized field flow fractionation device. **Lab on a Chip**, 5 (2005) p. 687-690.
- 263.Litzen A. and Wahlund K.-G. Improved separation speed and efficiency for proteins, nucleic acids and viruses in asymmetrical flow field flow fractionation. **J. Chromatogr. A**, 491 (1989) p. 413-421.
- 264.Litzen A., Garn M.B. and Widmer H.M. Determination of acid phosphatase in cultivation medium using asymmetrical flow field-flow fractionation. **J. Biotechnol.**, 37 (1994) p. 291-5.
- 265.Sklaviadis T., Dreyer R. and Manuelidis L. Analysis of Creutzfeldt-Jakob disease infectious fractions by gel permeation chromatography and sedimentation field flow fractionation. **Virus Res.**, 26 (1992) p. 241-54.
- 266.Wahlund K.G., Gustavsson M., MacRitchie F., Nylander T. and Wannerberger L. Size characterization of wheat proteins, particularly glutenin, by asymmetrical flow field-flow fractionation. **J. Cereal Sci.**, 23 (1996) p. 113-119.

- 267.Li P., Hansen M. and Giddings J.C. *Separation of lipoproteins from human plasma by flow field-flow fractionation.* **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, 20 (1997) p. 2777-2802.
- 268.Yohannes G., Pystynen K.-H., Riekkola M.-L. and Wiedmer S.K. Stability of phospholipid vesicles studied by asymmetrical flow field-flow fractionation and capillary electrophoresis. **Anal. Chimi. Acta**, 560 (2006) p. 50-56.
- 269.Yohannes G., Sneek M., Varjo S.J.O., Jussila M., Wiedmer S.K., Kovanen P.T., Oeoerni K. and Riekkola M.-L. *Miniaturization of asymmetrical flow field-flow fractionation and application to studies on lipoprotein aggregation and fusion.* **Anal. Biochem.**, 354 (2006) p. 255-265.
- 270.Sangsawong S., Shiowatana J. and Siripinyanond A. Matrix removal before inductively coupled plasma spectrometric detection: another capability of flow field-flow fractionation. **J. Anal. At. Spectrom.**, 21 (2006) p. 1336-1339.
- 271.Saeseaw S., Shiowatana J. and Siripinyanond A. Observation of salt-induced b-lactoglobulin aggregation using sedimentation field-flow fractionation. **Anal. Bioanal. Chem.**, 386 (2006) p. 1681-1688.
- 272.Roda A., Parisi D., Guardigli M., Zattoni A. and Reschiglian P. Combined approach to the analysis of recombinant protein drugs using hollow-fiber flow field-flow fractionation, mass spectrometry, and chemiluminescence detection. **Anal. Chem.**, 78 (2006) p. 1085-92. FIELD Reference Number: FIELD Journal Code:0370536 FIELD Call Number:.
- 273.Magliulo M., Roda B., Zattoni A., Michelini E., Luciani M., Lelli R., Reschiglian P. and Roda A. *An innovative, flow-assisted, noncompetitive chemiluminescent immunoassay for the detection of pathogenic bacteria.* **Clin. Chem.**, 52 (2006) p. 2151-2155.
- 274.Luo J., Leeman M., Ballagi A., Elfving A., Su Z., Janson J.-C. and Wahlund K.-G. Size characterization of green fluorescent protein inclusion bodies in E. coli using asymmetrical flow field-flow fractionation-multi-angle light scattering. **J. Chromatogr. A**, 1120 (2006) p. 158-164.
- 275.Lu H., Gaudet S., Schmidt M.A. and Jensen K.F. *A Microfabricated Device for Subcellular Organelle Sorting.* **Anal. Chem.**, 76 (2004) p. 5705-5712.
- 276.Mozersky S.M., Caldwell K.D., Jones S.B., Maleeff B.E. and Barford R.A. *Sedimentation field flow fractionation of mitochondrial and microsomal membranes from corn roots.* **Anal. Biochem.**, 172 (1988) p. 113-23.
- 277.Nilsson M., Bulow L. and Wahlund K.-G. Use of flow field-flow fractionation for the rapid quantitation of ribosome and ribosomal subunits in Escherichia coli at different protein production conditions. **Biotechnol. Bioeng.**, 54 (1997) p. 461-467.

278. Fettke J., Eckermann N., Tiessen A., Geigenberger P. and Steup M. Identification, subcellular localization and biochemical characterization of water-soluble heteroglycans (SHG) in leaves of *Arabidopsis thaliana* L.: Distinct SHG reside in the cytosol and in the apoplast. **Plant Journal**, 43 (2005) p. 568-585.

279. Giddings J.C., Yang F.J. and Myers M.N. Flow field-flow fractionation: new method for separating, purifying, and characterizing the diffusivity of viruses. **J. Virol.**, 21 (1977) p. 131-138.

280. Caldwell K.D., Nguyen T.T., Giddings J.C. and Mazzone H.M. Field-flow fractionation of alkali-liberated nuclear polyhedrosis virus from gypsy moth *Lymantria dispar* Linnaeus. **J. Virol. Methods**, 1 (1980) p. 241-56.

281. Yonker C.R., Caldwell K.D., Giddings J.C. and Van Etten J.L. *Physical characterization of PBCV virus by sedimentation field flow fractionation.* **J. Virol. Methods**, 11 (1985) p. 145-160.

282. Litzen A. and Wahlund K.G. Improved separation speed and efficiency for proteins, nucleic acids and viruses in asymmetrical flow field flow fractionation. **J. Chromatogr.**, 476 (1989) p. 413-21.

283. Hoffstetter-Kuhn S., Rosler T., Ehrat M. and Widmer H.M. *Characterization of yeast cultivations by steric sedimentation field-flow fractionation.* **Anal. Biochem.**, 206 (1992) p. 300-8.

284. Sharma R.V., Edwards R.T. and Beckett R. Physical characterization and quantification of bacteria by sedimentation field-flow fractionation. **Appl. Environ. Microbiol.**, 59 (1993) p. 1864-75.

285. Sharma R.V., Edwards R.T. and Beckett R. Analysis of bacteria in aquatic environments using sedimentation field-flow fractionation: (I) biomass determination. **Water Res.**, 32 (1998) p. 1497-1507.

286. Gao Y.-S., Lorbach S.C. and Blake R., II. *Separation of bacteria by sedimentation field-flow fractionation.* **J. Microcolumn Sep.**, 9 (1997) p. 497-501.

287. Yager P., Afromowitz M.A., Bell D., Forster F.K., Holl J.P., Kamholz A. and Weigla B. *Design of microfluidic sample preconditioning systems for detection of biological agents in environmental samples.* **Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.**, 3515 (1998) p. 252-259.

288. Lee H., Williams S.K.R., Wahl K.L. and Valentine N.B. Analysis of whole bacterial cells by flow field-flow fractionation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Anal. Chem.**, 75 (2003) p. 2746-2752.

289. Reschiglian P., Zattoni A., Roda B., Cinque L., Melucci D., Min Byung R. and Moon Myeong H. *Hyperlayer hollow-fiber flow field-flow fractionation of cells*. **J. Chromatogr. A.**, 985 (2003) p. 519-529.
290. Sanz R., Puignou L., Galceran Maria T., Reschiglian P., Zattoni A. and Melucci D. *Coupling gravitational and flow field-flow fractionation, and size-distribution analysis of whole yeast cells*. **Anal. Bioanal. Chem.**, 379 (2004) p. 1068-1075.
291. Jackson B.P., Ranville J.F. and Neal A.L. Application of flow field flow fractionation-ICPMS for the study of uranium binding in bacterial cell suspensions. **Anal. Chem.**, 77 (2005) p. 1393-1397.
292. Reschiglian P., Zattoni A., Roda B., Cinque L., Parisi D., Roda A., Dal Piaz F., Moon M.H. and Min B.R. *On-Line Hollow-Fiber Flow Field-Flow Fractionation-Electrospray Ionization/Time-of-Flight Mass Spectrometry of Intact Proteins*. **Anal. Chem.**, 77 (2005) p. 47-56.
293. Cho S.K., Shim S.H., Park K.R., Choi S.-H. and Lee S. Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp. G11 by asymmetrical flow field-flow fractionation (AsFIFFF). **Anal. Bioanal. Chem.**, 386 (2006) p. 2027-2033.
294. Chon K., Moon J., Kim S., Kim S.-D. and Cho J. *Bio-particle separation using microfluidic porous plug for environmental monitoring*. **Desalination**, 202 (2007) p. 215-223.
295. Garcia M.T., Sanz R., Galceran M.T. and Puignou L. Use of fluorescent probes for determination of yeast cell viability by gravitational field-flow fractionation. **Biotechnology Progress**, 22 (2006) p. 847-852.
296. Bigelow J.C., Giddings J.C., Nabeshima Y., Tsuruta T., Kataoka K., Okano T., Yui N. and Sakurai Y. *Separation of B and T lymphocytes by a hybrid field-flow fractionation/adhesion chromatography technique*. **J. Immunol. Methods**, 117 (1989) p. 289-93.
297. Cardot P.J., Gerota J. and Martin M. *Separation of living red blood cells by gravitational field-flow fractionation*. **J. Chromatogr.**, 568 (1991) p. 93-103.
298. Metreau J.M., Gallet S., Cardot P.J.P., Le Maire V., Dumas F., Hervann A. and Loric S. *Sedimentation field-flow fractionation of cellular species*. **Anal. Biochem.**, 251 (1997) p. 178-186.
299. Ikeya T., Kataoka K., Okano T. and Sakurai Y. Selective adhesion of rat lymphocyte subpopulation on the polymer surface with phenylboronic acid moieties: evaluation by field-flow fractionation/adhesion chromatography (FFF/AC) method. **React. Funct. Polym.**, 37 (1998) p. 251-261.
300. Huang Y., Wang X.B., Becker F.F. and Gascoyne P.R. *Introducing dielectrophoresis as a new force field for field-flow fractionation*. **Biophys. J.**, 73 (1997) p. 1118-1129.

301. Williams P.S., Moore L.R., Leigh D. and Zborowski M. *Use of quadrupole magnetic fields for separation of biological cells. Abstracts of Papers, 225th ACS National Meeting, New Orleans, LA, United States, March 23-27, 2003, (2003) p. ANYL-197.*
302. Cinque L., Williams P.S. and Zborowski M. *Sorting of unmodified human progenitor cells. Abstracts of Papers, 232nd ACS National Meeting, San Francisco, CA, United States, Sept. 10-14, 2006, (2006) p. ANYL-286.*
303. Jing Y., L.R. M., Schneider T., Williams P.S., Chalmers J.J., Farag S.S., Bolwell B. and Zborowski M. *Negative selection of hematopoietic progenitor cells by continuous magnetophoresis. Exp Hematol., 35 (2007) p. 662-672.*
304. Battu S., Roux A., Delebasee S., Bosgiraud C. and Cardot P.J.P. Sedimentation field-flow fractionation device cleaning, decontamination and sterilization procedures for cellular analysis. **J. Chromatogr. B**, 751 (2001) p. 131-141.
305. Masudo T. and Okada T. Low-capacity channel designed for particle separation with controlled electric fields and evaluation of involved forces. **J. Chromatogr. A**, 1106 (2006) p. 196-204.
306. Pasti L., Ventosa E.A., Mingozi I. and Dondi F. Determination of calibration function in thermal field flow fractionation under thermal field programming. **J. Sep. Sci.**, 29 (2006) p. 1088-1101.
307. Kronholm J., Vastamaeki P., Raesaenen R., Ahonen A., Hartonen K. and Riekkola M.-L. Thermal Field-Flow Fractionation and Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Determination of Decomposition Products of Expandable Polystyrene after Reactions in Pressurized Hot Water and Supercritical Water. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 45 (2006) p. 3029-3035.
308. Kim W.-S., Eum C.H., Molnar A., Yu J.-S. and Lee S. Repeatability and reproducibility of thermal field-flow fractionation in molecular weight determination of processed natural rubber. **Analyst**, 131 (2006) p. 429-433.
309. Kim H.-J., Oh S. and Moon M.H. Hollow-fiber flow/hyperlayer field-flow fractionation for the size characterization of airborne particle fractions obtained by SPLITT fractionation. **J. Sep. Sci.**, 29 (2006) p. 423-428.
310. Contado C. and Wahlund K.-G. High-speed separation and size characterization of wheat and barley starch granules by lift-hyperlayer asymmetrical flow field-flow fractionation in synergy with SPLITT fractionation. **Starch/Staerke**, 58 (2006) p. 140-154.
311. Cho J., Kim I.S., Moon J. and Kwon B. Determining Brownian and shear-induced diffusivity of nano- and micro-particles for sustainable membrane filtration. **Desalination**, 188 (2006) p. 213-216.

312. Williams P.S., Moon M.H. and Giddings J.C. Influence of accumulation wall and carrier solution composition on lift force in sedimentation/steric field-flow fractionation. **Colloids Surf., A**, 113 (1996) p. 215-228.
313. Schure M.R., Caldwell K.D. and Giddings J.C. *Theory of sedimentation hyperlayer field-flow fractionation*. **Anal. Chem.**, 58 (1986) p. 1509-16.
314. Martin M. and Williams P.S., Theoretical basis of field-flow fractionation, in *Theoretical Advancement in Chromatography and Related Separation Techniques*, Doni, F. and Guiochon, G., Editors. 1992, Kluwer: Dordrecht. p. 513-580.
315. Williams P.S., Moon M.H., Xu Y. and Giddings J.C. Effect of viscosity on retention time and hydrodynamic lift forces in sedimentation/steric field-flow fractionation. **Chem. Eng. Sci.**, 51 (1996) p. 4477-4488.
316. Chianea T., Cardot P.J.P., Assidjo E., Monteil J., Clarot I. and Krausz P. Field- and flow-dependent trapping of red blood cells on polycarbonate accumulation wall in sedimentation field-flow fractionation. **J. Chromatogr. B**, 734 (1999) p. 91-99.
317. Andreev V.P. and Stefanovich L.A. Theory of field-flow fractionation with the reversible adsorption on channel walls. **Chromatographia**, 37 (1993) p. 325-8.
318. Giddings J.C., Chen X., Wahlund K.G. and Myers M.N. *Fast particle separation by flow/steric field-flow fractionation*. **Anal. Chem.**, 59 (1987) p. 1957-62.
319. Koch T. and Giddings J.C. High-speed separation of large (>1 μm) particles by steric field-flow fractionation. **Anal. Chem.**, 58 (1986) p. 994-7.
320. Assidjo E., Chianea T., Dreyfuss M.-F. and Cardot P.J.P. *Validation procedures of sedimentation field-flow fractionation techniques for biological applications*. **J. Chromatogr. B**, 709 (1998) p. 197-207.
321. Assidjo N.E., Chianea T., Clarot I., Dreyfuss M.F. and Cardot P.J. *Osmolarity effects on red blood cell elution in sedimentation field-flow fractionation*. **J. Chromatogr. Sci.**, 37 (1999) p. 229-236.
322. Giddings J.C. A pinched inlet system for reduced relaxation effects and stopless flow injection in field-flow fractionation. **Sep. Sci. Technol.**, 24 (1989) p. 755-68.
323. Moon M.H., Myers M.N. and Giddings J.C. Evaluation of pinched inlet channel for stopless flow injection in steric field-flow fractionation. **J. Chromatogr.**, 517 (1990) p. 423-33.
324. Lee S., Myers M.N. and Giddings J.C. Hydrodynamic relaxation using stopless flow injection in split inlet sedimentation field-flow fractionation. **Anal. Chem.**, 61 (1989) p. 2439-44.
325. Martin M. Onset of non-linearity in zonal elution separators: The concept of effective analyte concentration. **J. Chromatogr. A**, 1126 (2006) p. 129-142.

326. Cardot P., Battu S. and Sarrazin R., Field flow fractionation separation device with a separation channel and a counter channel, in Eur. Pat. Appl. **2006**, (Universite de Limoges, Fr.). Ep. p. 20 pp.
327. Salesse C., Battu S., Begaud-Grimaud G., Cledat D., Cook-Moreau J. and Cardot P.J.P. *Sedimentation field flow fractionation monitoring of bimodal wheat starch amylolysis*. **J. Chromatogr. A**, 1129 (2006) p. 247-254.
328. Caldwell K.D., Brimhall S.L., Gao Y. and Giddings J.C. *Sample overloading effects in polymer characterization by field-flow fractionation*. **J. Appl. Polym. Sci.**, 36 (1988) p. 703-19.
329. Carlshaf A. and Jonsson J.A. Perturbations of the retention parameter due to sample overloading in hollow-fiber flow field-flow fractionation. **Sep. Sci. Technol.**, 28 (1992) p. 1191-201.
330. Reschiglian P., Martin M., Contado C. and Dondi F. *Assessment of linearity conditions in thermal field-flow fractionation by peak shape analysis*. **Int. J. Polym. Anal. Charact.**, 3 (1997) p. 107-130.
331. Moon M.H. and Giddings J.C. *Size distribution of liposomes by flow field-flow fractionation*. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 11 (1993) p. 911-20.
332. Moon M.H. and Giddings J.C. Rapid separation and measurement of particle size distribution of starch granules by sedimentation/steric field-flow fractionation. **J. Food Sci.**, 58 (1993) p. 1166-71.
333. Schallinger L.E. and Kaminski L.A. *Sedimentation field-flow fractionation: a promising new bioseparations technique*. **BioTechniques**, 3 (1985) p. 124-8, 130-1, 134-5.
334. Urbankova E., Vacek A., Novakova N., Matulik F. and Chmelik J. *Investigation of red blood cell fractionation by gravitational field-flow fractionation*. **J. Chromatogr.**, 583 (1992) p. 27-34.
335. Yue V., Kowal R., Nearing L., Bond L., Muetterties A. and Parsons R. *Miniature field-flow fractionation system for analysis of blood cells*. **Clin. Chem.**, 40 (1994) p. 1810-1814.
336. Cardot P.J.P., Elgea C., Guernet M., Godet D. and Andreux J.P. Size- and density-dependent elution of normal and pathological red blood cells by gravitational field-flow fractionation. **J. Chromatogr. B**, 654 (1994) p. 193-203.
337. Cardot P.J.P., Battu S., Chianea T. and Rasouli S., *Cells and cell Organelles: Field-Flow Fractionation*, in *Encyclopedia of separation science*, Wilson, I.D., Adlard, E.R., Cooke, M. and Poole, C.F., Editors. **2000**, Academic Press: London. p. 2267-2271.

338. Bouamrane F., Assidjo N.E., Bouteille B., Dreyfuss M.F., Darde M.L. and Cardot P.J.P. *Sedimentation field-flow fractionation application to toxoplasma gondii separation and purification*. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 20 (1999) p. 503-512.
339. Blagosklonny M.V. *Hormonal and differentiation agents in cancer growth suppression*. **Methods Mol. Biol.**, 223 (2003) p. 505-522.
340. Sharma R.V., Edwards R.T. and Beckett R. Analysis of bacteria in aquatic environments using sedimentation field-flow fractionation: (II) physical characterization of cells. **Water Res.**, 32 (1998) p. 1508-1514.
341. Morelon X., Battu S., Salesse C., Begaud-Grimaud G., Clédât D. and Cardot P.J.P. *Sedimentation field flow fractionation monitoring of rice starch amylolysis*. **J. Chromatogr. A**, 1093 (2005) p. 147-155.
342. Yang J., Huang Y., Wang X.-B., Becker F.F. and Gascoyne P.R.C. Cell Separation on Microfabricated Electrodes Using Dielectrophoretic/Gravitational Field-Flow Fractionation. **Anal. Chem.**, 71 (1999) p. 911-918.
343. Krause M., Prager J., Zhou X., Yaromina A., Dörfler A., Eicheler W. and Baumann M. EGFR-TK inhibition before radiotherapy reduces tumour volume but does not improve local control: Differential response of cancer stem cells and nontumorigenic cells? **Radiother. Oncol.**, (2007) p.
344. Cardot P., Battu S. and Sarrazin R., *Swivel joint for conduits used in analytical chemistry*, in *Fr. Demande*. 2006, (Universite De Limoges, Fr.). Fr. p. 25 pp.
345. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 16 (1983) p. 55-63.
346. Sreenath H.K. Studies on starch granules digestion by α -amylase. **Starch/Staerke**, 44 (1992) p. 61-3.
347. Sarikaya E., Higasa T., Adachi M. and Mikami B. *Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules*. **Process Biochemistry (Oxford)**, 35 (2000) p. 711-715.
348. Guzman-Maldonado H. and Paredes-Lopez O. *Amyolytic enzymes and products derived from starch: a review*. **Crit. Rev. Food Sci.**, 35 (1995) p. 373-403.
349. Ellis R.P., Cochrane M.P., Dale M.F.B., Duffus C.M., Lynn A., Morrison I.A., Prentice R.D.M., Swanston J.S. and Tiller S.A. *Starch production and industrial use*. **J. Sci. Food Agric.**, 77 (1998) p. 289-311.
350. Davis J.P., Supatcharee N., Khandelwal R.L. and Chibbar R.N. *Synthesis of novel starches in planta: opportunities and challenges*. **Starch/Staerke**, 55 (2003) p. 107-120.

351. Textor S.D., Hill G.A., Macdonald D.G. and St Denis E. *Cold enzyme hydrolysis of wheat starch granules*. **Can. J. Chem. Eng.**, 76 (1998) p. 87-93.
352. Matsubara T., Ben Ammar Y., Anindyawati T., Yamamoto S., Ito K., Iizuka M. and Minamiura N. *Degradation of raw starch granules by α -amylase purified from culture of *Aspergillus awamori* KT-11*. **J. Biochem. Mol. Biol.**, 37 (2004) p. 422-428.
353. Matsubara T., Ben Ammar Y., Anindyawati T., Yamamoto S., Ito K., Iizuka M. and Minamiura N. *Molecular cloning and determination of the nucleotide sequence of raw starch digesting α -amylase from *Aspergillus awamori* KT-11*. **J. Biochem. Mol. Biol.**, 37 (2004) p. 429-438.
354. Lindeboom N., Chang P.R. and Tyler R.T. *Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review*. **Starch/Staerke**, 56 (2004) p. 89-99.
355. Buleon A., Colonna P., Planchot V. and Ball S. *Starch granules: structure and biosynthesis*. **Int. J. Biol. Macromol.**, 23 (1998) p. 85-112.
356. Jane J.L., Kasemsuwan T., Leas S., Zobel H. and Robyt J.F. *Anthology of starch granule morphology by scanning microscopy*. **Starch/Stärke**, 46 (1994) p. 121-129.
357. Peng M., Gao M., Abdel-Aal E.-S.M., Hucl P. and Chibbar R.N. *Separation and characterization of A- and B-type starch granules in wheat endosperm*. **Cereal Chem.**, 76 (1999) p. 375-379.
358. Sivak M. and Preiss J., *Starch: Basic science to Biotechnology*. **Advances in Food and Nutrition Research**, ed. Taylor, H.M. Vol. 41. 1998, New York: Academic Press. 199.
359. Stark J.R. and Lynn A. *Starch granules large and small*. **Biochemical Society Transactions**, 20 (1992) p. 7-12.
360. Janouskova J., Budinska M., Plockova J. and Chmelik J. *Optimization of experimental conditions for the separation of small and large starch granules by gravitational field-flow fractionation*. **J. Chromatogr., A**, 914 (2001) p. 183-187.
361. Farmakis L., Sakellarakis J., Koliadima A., Gavril D. and Karaiskakis G. *Size analysis of barley starch granules by sedimentation/steric field flow fractionation*. **Starch/Staerke**, 52 (2000) p. 275-282.
362. Meredith P. *Large and small starch granules in wheat - are they really different?* **Starch/Staerke**, 33 (1981) p. 40-4.
363. Lauro M., Forssell P.M., Suortti M.T., Hulleman S.H.D. and Poutanen K.S. *α -Amylolysis of large barley starch granules*. **Cereal Chem.**, 76 (1999) p. 925-930.

- 364.Colonna P., Buleon A. and Lemarie F. *Action of Bacillus subtilis .alpha.-amylase on native wheat starch.* **Biotechnol. Bioeng.**, 31 (1988) p. 895-904.
- 365.Franco C.M.L. and Ciacco C.F. Factors that affect the enzymic degradation of natural starch granules - effect of the size of the granules. **Starch/Staerke**, 44 (1992) p. 422-6.
- 366.Baldwin P.M., Davies M.C. and Melia C.D. Starch granule surface imaging using low-voltage scanning electron microscopy and atomic force microscopy. **Int. J. Biol. Macromol.**, 21 (1997) p. 103-107.
- 367.Wang W.J., Powell A.D. and Oates C.G. *Pattern of enzyme hydrolysis in raw sago starch: effects of processing history.* **Carbohydr. Polym.**, 26 (1995) p. 91-7.
- 368.Ohtani T., Yoshio T., Hagiwara S. and Maekawa T. *High-resolution imaging of starch granule structure using atomic force microscopy.* **Starch/Staerke**, 52 (2000) p. 150-153.
- 369.Gerard C., Colonna P., Buleon A. and Planchot V. *Amylolysis of maize mutant starches.* **J. Sci. Food Agr.**, 81 (2001) p. 1281-1287.
- 370.Tang H., Watanabe K. and Mitsunaga T. Structure and functionality of large, medium and small granule starches in normal and waxy barley endosperms. **Carbohydr. Polym.**, 49 (2002) p. 217-224.
- 371.Yook C. and Robyt J.F. Reactions of alpha amylases with starch granules in aqueous suspension giving products in solution and in a minimum amount of water giving products inside the granule. **Carbohydr. Res.**, 337 (2002) p. 1113-1117.
- 372.Caldwell K.D. *Field-flow fractionation of particles.* **Chem. Anal.**, 73 (1984) p. 211-250.
- 373.You S., Stevenson S.G., Izydorczyk M.S. and Preston K.R. Separation and characterization of barley starch polymers by a flow field-flow fractionation technique in combination with multiangle light scattering and differential refractive index detection. **Cereal Chem.**, 79 (2002) p. 624-630.
- 374.Reschiglian P., Zattoni A., Casolari S., Krumlova A., Budinska M. and Chmelik J. Size characterization of barley starch granules by gravitational field-flow fractionation: A rapid, low-cost method to assess the brewing capability of different strains. **Ann. Chim. (Rome)**, 92 (2002) p. 457-467.
- 375.Farmakis L., Karaiskakis G. and Koliadima A. Investigation of the variation of the mass ratios for large and small starch granules with the pH and ionic strength of the dispersing medium by sedimentation/steric field-flow fractionation. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, 25 (2002) p. 2135-2152.

376. Contado C. and Dondi F. Barley starch granules subject to SPLITT cell fractionation and Sd/StFFF size characterization. **Starch/Staerke**, 53 (2001) p. 414-423.
377. Contado C., Reschiglian P., Faccini S., Zattoni A. and Dondi F. *Continuous split-flow thin cell and gravitational field-flow fractionation of wheat starch particles*. **J. Chromatogr. A**, 871 (2000) p. 449-460.
378. Chmelik J., Krumlova A., Budinska M., Kruml T., Psota V., Bohacenko I., Mazal P. and Vydrova H. Comparison of size characterization of barley starch granules determined by electron and optical microscopy, low angle laser light scattering and gravitational field-flow fractionation. **J. Inst. Brew.**, 107 (2001) p. 11-17.
379. Chmelik J. and Psota V. *Characterization of starch materials from barley*. **Proc. Congr. - Eur. Brew. Conv.**, 27th (1999) p. 421-428.
380. Bernfeld P., *Amylases α et β* , in *Method Enzymol.*, Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., Editors. 1955, Elsevier USA: Baltimore. p. 149-157.
381. Gilman-Sachs A. *Flow cytometry*. **Anal. Chem.**, 66 (1994) p. 700A-707A.
382. Shapiro H.M. Optical measurements in cytometry: light scattering, extinction, absorption, and fluorescence. **Methods Cell Biol.**, 63 (2001) p. 107-29.
383. Hoffman R.A. *Standardization and quantitation in flow cytometry*. **Methods Cell Biol.**, 63 (2001) p. 299-340.
384. Bohren C.F. and Huffman D.R., *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. 1998, New York: John Wiley & Sons. 530.
385. Helbert W., Schulein M. and Henrissat B. Electron microscopic investigation of diffusion of *Bacillus licheniformis* α -amylase into corn starch granules. **Int. J. Biol. Macromol.**, 19 (1996) p. 165-169.
386. Barman B.N. and Giddings J.C. Separation and characterization of polymeric latex beads and aggregates by sedimentation field-flow fractionation. **ACS Symp. Ser.**, 521 (1993) p. 30-46.
387. Barman B.N. and Giddings J.C. Separation of Colloidal Latex Aggregates by Cluster Mass and Shape Using Sedimentation Field-Flow Fractionation with Steric Perturbations. **Anal. Chem.**, 67 (1995) p. 3861-5.
388. Kim W.-S., Lee D.W. and Lee S. Size Characterization of Incinerator Fly Ash Using Sedimentation/Steric Field-Flow Fractionation. **Anal. Chem.**, 74 (2002) p. 848-855.
389. Kirkland J.J., Schallinger L.E. and Yau W.W. Effect of particle conformation on retention in sedimentation field flow fractionation. **Anal. Chem.**, 57 (1985) p. 2271-5.

- 390.Koch L., Koch T. and Widmer H.M. *Sedimentation field-flow fractionation for pigment quality assessment*. **J. Chromatogr.**, 517 (1990) p. 395-403.
- 391.Miller M., Jiang Y. and Hansen M.E. *Using FFF techniques to explore the properties of starch*. **Book of Abstracts, 216th ACS National Meeting, Boston, August 23-27, (1998)** p. AGFD-151.
- 392.Reschiglian P., Melucci D. and Torsi G. Experimental study on the retention of silica particles in gravitational field-flow fractionation. Effects of the mobile phase composition. **J. Chromatogr., A**, 740 (1996) p. 245-252.
- 393.Park Y.H., Lee D.W. and Moon M.H. Characterization of rod-shape magnetic particles by sedimentation field-flow fractionation and electron microscopy: particle size and length distribution. **Instrum. Sci. Technol.**, 25 (1997) p. 133-145.
- 394.Beckett R., Jiang Y., Liu G., Moon M.H. and Giddings J.C. *Separation and behavior of nonspherical particles in sedimentation/steric field-flow fractionation*. **Part. Sci. Technol.**, 12 (1994) p. 89-113.
- 395.Beckett R. and Giddings J.C. Entropic contribution to the retention of nonspherical particles in field-flow fractionation. **J. Colloid Interface Sci.**, 186 (1997) p. 53-59.
- 396.Blau P. and Zollars R.L. *Sedimentation field-flow fractionation of nonspherical particles*. **J. Colloid Interface Sci.**, 183 (1996) p. 476-483.
- 397.Cornel H.J., Hoveling A.W., Chryss A. and Rogers M. *Particle size distribution in wheat starch and its importance in processing*. **Starch/Staerke**, 46 (1994) p. 203-207.
- 398.MacGregor A.W. and Ballance D.L. Hydrolysis of large and small granules from normal and waxy barley cultivars by alpha-amylase from barley malt. **Cereal Chem.**, 57 (1980) p. 397-402.
- 399.Li S., Nickels J. and Palmer A.F. *Liposome-encapsulated actin-hemoglobin (LEAcHb) artificial blood substitutes*. **Biomaterials**, 26 (2005) p. 3759-3769.
- 400.Arifin D.R. and Palmer A.F. Determination of size distribution and encapsulation efficiency of liposome-encapsulated hemoglobin blood substitutes using asymmetric flow field-flow fractionation coupled with multi-angle static light scattering. **Biotechnol. Prog.**, 19 (2003) p. 1798-1811.
- 401.Huang Y., Yang J., Wang X.B., Becker F.F. and Gascoyne P.R. The removal of human breast cancer cells from hematopoietic CD34+ stem cells by dielectrophoretic field-flow-fractionation. **J. Hematoh. Stem. Cell**, 8 (1999) p. 481-490.

- 402.Sanz R., Galceran M.T. and Puignou L. Determination of viable yeast cells by gravitational field-flow fractionation with fluorescence detection. **Biotechnol. Prog.**, 20 (2004) p. 613-618.
- 403.Reschiglian P., Zattoni A., Cinque L., Roda B., Dal Piaz F., Roda A., Moon M.H. and Min B.R. Hollow-Fiber Flow Field-Flow Fractionation for Whole Bacteria Analysis by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Anal. Chem.**, 76 (2004) p. 2103-2111.
- 404.Kang D. and Moon M.H. Hollow Fiber Flow Field-Flow Fractionation of Proteins Using a Microbore Channel. **Anal. Chem.**, 77 (2005) p. 4207-4212.
- 405.Carpino F., Zborowski M. and Williams P.S. *Analysis of magnetic nanoparticles using quadrupole magnetic field-flow fractionation*. **Abstracts of Papers, 229th ACS National Meeting, San Diego, CA, United States, March 13-17, 2005**, (2005) p. ANYL-279.
- 406.Andersson C.I.J., Arfvidsson C., Kallio P.T., Wahlund K.G. and Buelow L. Enhanced ribosome and tRNA contents in Escherichia coli expressing a truncated Vitreoscilla hemoglobin mutant analyzed by flow field-flow fractionation. **Biotechnol. Lett.**, 25 (2003) p. 1499-1504.
- 407.Andersson M., Fromell K., Gullberg E., Artursson P. and Caldwell K.D. Characterization of Surface-Modified Nanoparticles for in Vivo Biointeraction. A Sedimentation Field Flow Fractionation Study. **Anal. Chem.**, 77 (2005) p. 5488-5493.
- 408.Fraunhofer W. and Winter G. The use of asymmetrical flow field-flow fractionation in pharmaceuticals and biopharmaceuticals. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 58 (2004) p. 369-383.
- 409.Wyllie A.H. *Apoptosis: an overview*. **Brit. Med. Bull.**, 53 (1997) p. 451-65.
- 410.Nervi F., Marinovic I.R., A. and Ulloa N. Regulation of biliary cholesterol secretion. Functional relationship between the canalicular and sinusoidal cholesterol secretory pathways in the rat. **J. Clin. Invest.**, 82 (1988) p. 1818-1825.
- 411.Turchan J., Pocerlich C.B., Gairola C., Chauhan A., Schifitto G., Butterfield D.A., Buch S., Narayan O., Sinai A., Geiger J., Berger J.R., Elford H. and Nath A. *Oxidative stress in HIV demented patients and protection ex vivo with novel antioxidants*. **Neurology**, 60 (2003) p. 307-314.
- 412.Liagre B., Vergne-Salle P., Corbiere C., Charissoux J.L. and Beneytout J.L. Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in human rheumatoid arthritis synoviocytes with cyclooxygenase-2 overexpression. **Arthritis Res. Ther.**, 6 (2004) p. 373-383.
- 413.Leger D.Y., Liagre B., Corbiere C., Cook-Moreau J. and Beneytout J.-L. Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in HEL cells with increase in intracellular calcium level, activation of cPLA2 and COX-2 overexpression. **Int. J. Oncol.**, 25 (2004) p. 555-562.

414. Pazourek J. and Chmelik J. Optimization of the separation of micron-sized latex particles by gravitational field-flow fractionation. **Chromatographia**, 35 (1993) p. 591-6.
415. Kassab J.R., Cardot P.J.P., Zahoransky R.A. and Battu S. *Fast "hyperlayer" separation development in sedimentation field flow fractionation*. **J. Chromatogr. B**, 826 (2005) p. 8-16.
416. Abemayor E. and Sidell N. Human neuroblastoma cell lines as models for the in vitro study of neoplastic and neuronal cell differentiation. **Environ. Health Perspect.**, 80 (1989) p. 3-15.
417. Brodeur G.M., Seeger R.C., Schwab M., Varmus H.E. and Bishop J.M. *Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage*. **Science**, 224 (1984) p. 1121-4.
418. Schwab M., Ellison J., Busch M., Rosenau W., Varmus H.E. and Bishop J.M. Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 81 (1984) p. 4940-4944.
419. Berthold F., Hero B., Kremens B., Handgretinger R., Henze G., Schilling F.H., Schrappe M., Simon T. and Spix C. Long-term results and risk profiles of patients in five consecutive trials (1979-1997) with stage 4 neuroblastoma over 1 year of age. **Cancer Lett.**, 197 (2003) p. 11-7.
420. De Bernardi B., Nicolas B., Boni L., Indolfi P., Carli M., Cordero Di Montezemolo L., Donfrancesco A., Pession A., Provenzi M., di Cataldo A., Rizzo A., Tonini G.P., Dallorso S., Conte M., Gambini C., Garaventa A., Bonetti F., Zanazzo A., D'Angelo P. and Bruzzi P. *Disseminated neuroblastoma in children older than one year at diagnosis: comparable results with three consecutive high-dose protocols adopted by the Italian Co-Operative Group for Neuroblastoma*. **J. Clin. Oncol.**, 21 (2003) p. 1592-601.
421. Hopkins-Donaldson S., Yan P., Bourloud K.B., Muhlethaler A., Bodmer J.L. and Gross N. Doxorubicin-induced death in neuroblastoma does not involve death receptors in S-type cells and is caspase-independent in N-type cells. **Oncogene**, 21 (2002) p. 6132-6137.
422. Voigt A., Hartmann P. and Zintl F. Differentiation, proliferation and adhesion of human neuroblastoma cells after treatment with retinoic acid. **Cell Adhes. Commun.**, 7 (2000) p. 423-40.
423. Levin S. *Field flow fractionation in biomedical analysis*. **Biomed. Chromatogr.**, 5 (1991) p. 133-137.
424. Gascoyne P., Satayavivad J. and Ruchirawat M. *Microfluidic approaches to malaria detection*. **Acta Trop.**, 89 (2004) p. 357-369.

425. Harold C., Chazala G., Goridisa C. and Represa A. *NCAM Is Essential for Axonal Growth and Fasciculation in the Hippocampus*. **Mol. Cell. Neurosci.**, 8 (2002) p. 323-335.
426. Ronn L.C., Berezin E. and Bock E. *The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing*. **Int. J. Dev. Neurosci.**, 18 (2000) p. 193-199.
427. Thomas S.K., Messam C.A., Spengler B.A., Biedler J.L. and Ross R.A. *Nestin is a potential mediator of malignancy in human neuroblastoma cells*. **J. Biol. Chem.**, 279(27): (2004) p. 27994-9.
428. Kim H.R., Kim E.J., Yang S.H., Jeong E.T., Park C., Kim S.J., Youn M.J., So H.S. and Park R. *Combination treatment with arsenic trioxide and sulindac augments their apoptotic potential in lung cancer cells through activation of caspase cascade and mitochondrial dysfunction*. **Int. J. Oncol.**, 28 (2006) p. 1401-1408.
429. Goillot E., Raingeaud J., Ranger A., Tepper R.I., Davis R.J., Harlow E. and Sanchez I. *Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signaling pathway*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 94 (1997) p. 3302-3307.
430. Gallagher H.C., Odumeru O.A. and Regan C.M. *Regulation of neural cell adhesion molecule polysialylation state by cell-cell contact and protein kinase C delta*. **J. Neurosci. Res.**, 61(6) (2000) p. 636-45.
431. Bonfanti L. *PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis*. **Prog. Neurobiol.**, 80(3) (2006) p. 129-64.
432. Fulda S., Sieverts H., Friesen C., Herr I. and Debatin K.M. *The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells*. **Cancer Res.**, 57 (1997) p. 3823-3829.
433. Gross N., Balmas K., Beretta Brognara C. and Tschopp J. *Expression of Fas (APO-1/CD95) and Fas ligand (FasL) in human neuroblastoma*. **Med. Pediatr. Oncol.**, 36 (2001) p. 111-114.
434. Barthlen W., Schäfer J., Girgert R., Schuster M. and Schweizer P. *Apoptosis of cultured neuroblastoma cells is induced by ceramide and not by ligation of the Fas/Apo-1/CD95 receptor*. **Chemotherapy**, 45 (1999) p. 258-267.
435. Kim K.M., Lee K., Hong Y.S. and Park H.Y. *Fas-mediated apoptosis and expression of related genes in human malignant hematopoietic cells*. **Exp. Mol. Med.**, 32 (2000) p. 246-254.
436. Jadhav U., Ezhilarasan R., Vaughn S.F., Berhow M.A. and Mohanam S. *Iberin induces cell cycle arrest and apoptosis in human neuroblastoma cells*. **Int J Mol Med.**, 19 (2007) p. 353-361.

437. Annicchiarico-Petruzzelli M., Bernassola F., Lovat P.E., Redfern C.P., Pearson A.D. and Melino G. *Apoptosis in neuroblastomas induced by interferon-gamma involves the CD95/CD95L pathway.* **Me. Pediatr. Oncol.**, 36 (2001) p. 115-117.

438. Schaefer J.T., Barthlen W. and Schweizer P. Ceramide induces apoptosis in neuroblastoma cell cultures resistant to CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis. **J. Pediatr. Surg.**, 35 (2000) p. 473-479.

439. Sumantran V.N., Brederlau A. and Funa K. BMP-6 and retinoic acid synergistically differentiate the IMR-32 human neuroblastoma cells. **Anticancer Res.**, 23 (2003) p. 1297-1303.

440. Joshi S., Guleria R.S., Pan J., Dipette D. and Singh U.S. Heterogeneity in retinoic acid signaling in neuroblastomas: Role of matrix metalloproteinases in retinoic acid-induced differentiation. **Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.**, (2007) p.

441. Léger D.Y., Liagre B. and Beneytout J.L. Role of MAPKs and NF- κ B in diosgenin-induced megakaryocytic differentiation and subsequent apoptosis in HEL cells. **Int. J. Oncol.**, In press (2005) p.

442. Reyes M.R. and Lazalde B. Aortic preadipocyte differentiation into adipocytes induced by rosiglitazone in an in vitro model. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.**, (2007) p. Epub ahead of print].

443. Crossno J.T., Majka S.M., Grazia T., Gill R.G. and Klemm D.J. Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells. **J. Clin. Invest.**, 116 (2006) p. 3220-3228.

444. Servidei T., Morosetti R., Ferlini C., Cusano G., Scambia G., Mastrangelo R. and Koeffler H.P. *The cellular response to PPAR γ ligands is related to the phenotype of neuroblastoma cell lines.* **Oncol. Res.**, 14 (2004) p. 345-354.

IV. TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	VI
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
INTRODUCTION.....	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	4
FRACTIONNEMENT PAR COUPLAGE FLUX-FORCE	5
A. Principes généraux de la FFF.....	5
B. Les modes d'éluion.	9
1. Mode normal ou mode brownien.	10
2. Mode Stérique-Inertiel, mode par focalisation.	11
2.1. Mode Inertiel.....	11
2.2. Mode Stérique	13
C. Facteur de rétention.....	14
CANCER.....	19
A. Généralités	19
B. apoptose.....	20
1. Historique et définition.	20
2. Rôle physiologique.	21
3. Caractéristiques des cellules apoptotiques.....	21
4. Les voies d'induction de l'apoptose.....	24
4.1. Généralité sur le récepteur Fas.....	25
4.1.1. Structure de la protéine Fas.....	26
a) Partie extracellulaire.	26
b) Partie intracellulaire.....	27
4.2. Voies d'induction du récepteur Fas.	27
4.2.1. Voie apoptotique.	27
4.2.2. Voie proliférative.	28
4.3. Rôles physiologiques et pathologiques.....	29
4.3.1. Rôle dans le système immunitaire.	29
4.3.2. Rôle dans le système nerveux.	30
a) Fas et neurones.....	31
b) Fas et cellules neuroblastiques.....	32
4.4. Rôle de Fas dans les thérapeutiques anti-cancéreuses.	32
5. Pathologies et dérégulations.....	33
6. Généralités sur les ostéosarcomes.....	35
6.1. Symptômes.....	35
6.2. Le diagnostic.....	35
6.3. L'étiologie.....	36
6.4. Classification des ostéosarcomes.....	37

6.5. Evolution de la maladie.....	37
6.6. Traitement.	38
6.6.1. Ostéosarcome, non métastatique.....	38
6.6.2. Ostéosarcome métastatique.....	38
6.6.3. Récidives.....	39
7. Ostéosarcome et apoptose.....	39
7.1. Les stéroïdes végétaux.....	39
7.2. La diosgénine.....	40
C. Differentiation.....	43
1. Généralités.....	43
2. Neuroblastome.....	44
2.1. Epidémiologie.....	45
2.2. Présentation clinique.....	45
2.3. Diagnostic.....	47
2.4. Pronostic.....	49
2.5. Traitement.....	51
2.6. Conclusions / Perspectives.....	52
3. Thérapies de différenciation.....	53
3.1. Généralités.....	53
3.2. Neuroblastomes.....	54
3.2.1. Les neurotrophines.....	54
3.2.2. Les rétinoides.....	54
3.2.3. Les thiazolidinediones.....	55
D. Notions de cellules souches cancéreuses.....	57
1. Généralités.....	57
2. " Des cellules souches qui ne nous veulent pas du bien ! ».....	57
TRI CELLULAIRE PAR SdFFF : MÉTHODOLOGIES ET APPLICATIONS.....	61
A. Sedimentation Field-Flow Fractionation : recent advance in instrumentation and cell separation application.....	Erreur ! Signet non défini.
1. SdFFF cell separation methods and applications.....	64
1.1. Cell separation methods.....	64
1.2. Interest of SdFFF in cell sorting.....	65
1.2.1. non invasive method.....	65
a) Instrumental design and setup.....	65
b) Optimal elution conditions.....	66
c) Respect of cellular integrity.....	68
d) Analytical requirements.....	69
1.2.2. Simple, fast and tagless method.....	70
1.3. From fraction collection to fractogram calibration.....	71
1.3.1. Elution and fraction collection.....	71
1.3.2. Biological calibration.....	73
1.4. Recent applications and perspectives in mammalian cells separation.....	75
1.4.1. Oncology.....	75
1.4.2. monitoring of biological events (BE).....	76
1.4.3. cell separation of specific subpopulations.....	79
1.4.4. mechanism and kinetics investigation.....	81
1.4.5. ecology of complex population.....	82
1.4.6. Immature and stem cells.....	83

MATERIELS ET METHODES.....	84
FRACTIONNEMENT PAR COUPLAGE FLUX FORCE DE SEDIMENTATION (SdFFF).....	85
A. La SdFFF.....	85
B. Instrumentation.....	86
C. Développement instrumental de phase-1.	87
1. Les joints tournants.	88
2. Le bol de centrifugation.	89
D. Matériel chromatographique.	93
CULTURES CELLULAIRES.	94
A. Lignée d'ostéosarcome humain 1547.....	94
1. Conditions de culture.	94
2. Conditions de traitement.	94
3. Tri par SdFFF.....	95
B. Lignée neuroblastique humaine IMR-32.....	95
1. Conditions de culture.	95
2. Tri par SdFFF.....	96
C. Condition de stimulation des cellules.....	96
ETUDE DE LA VIABILITE ET DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRES.	97
A. Méthode d'évaluation de la viabilité cellulaire par le test au MTT.	97
B. Détection de la prolifération des cellules par incorporation de BrdU.....	97
C. Étude de la morphologie des cellules traitées à la diosgénine par microscopie optique à contraste de phase.	98
DÉTECTION DE LA MORT CELLULAIRE.	99
A. Détection de la libération des nucléosomes solubles par la méthode E.L.I.S.A.	99
B. Mise en évidence de l'apoptose par la méthode TUNEL.....	100
C. Mise en évidence de l'apoptose par Annexine V-FITC et cytométrie en flux.....	100
IMMUNOCYTOCHIMIE PAR IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE.	102
A. Principe.	102
B. Les contrôles.	104
COMPTEUR DE PARTICULES COULTER COUNTER®	105
A. Principe.	105
RESULTATS / DISCUSSION	107
SUIVI (MONITORING) PAR SdFFF DE L'HYDROLYSE α -AMYLOSIQUE DES AMIDONS DE RIZ ET DE BLE.....	108
A. Sedimentation Field Flow Fractionation Monitoring of Rice Starch Amylolysis.	110
1. Abstract.	110
2. Introduction.....	111
3. Materials and Methods.....	113
3.1. Materials.....	113

3.2. Enzymatic hydrolysis	113
4. SdFFF device and starch elution conditions.	113
4.1. Flow cytometry.	114
5. Results and discussion.	116
5.1. Rice starch SdFFF elution.....	116
5.2. Amylolysis monitoring by SdFFF.....	118
5.3. Starch granule modification.	122
6. Conclusion.	126
7. Acknowledgement.	126
B. Sedimentation Field Flow Fractionation Monitoring of Bimodal Wheat Starch Amylolysis.	127
1. Abstract.	127
2. Introduction.	128
3. Materials and Methods.	130
3.1. Materials.....	130
3.2. Enzymatic hydrolysis	130
3.3. SdFFF device and starch elution conditions.	130
3.4. Coulter Counter.....	131
4. Results and discussion.	132
4.1. Wheat starch SdFFF elution and particle size distribution.	132
4.2. Amylolysis monitoring by SdFFF.....	136
4.3. Starch granule size distribution modification during amylolysis.....	140
4.3.1. A granules	141
4.3.2. B granules	143
5. Conclusion.	144
6. Acknowledgement.	144
C. Discussion / Conclusion.	145
ISOLEMENT DE CELLULES PRE-APOPTOTIQUES. INFLUENCE DE L'ÉPAISSEUR DU CANAL SUR L'EFFICACITÉ DU TRI CELLULAIRE.	149
A. Pre-apoptotic sub-population cell sorting from diosgenin apoptosis induced 1547 cells by Sedimentation Field-Flow Fractionation. The effect of channel thickness on sorting performance.	151
1. Abstract.	151
2. Introduction.	152
3. Materials and methods.	154
3.1. Cell line, cell culture, treatment and light microscopy.	154
3.2. SdFFF device and cell elution conditions.	154
3.3. Coulter Counter.....	156
3.4. MTT assays.	156
3.5. Apoptosis quantification.	156
3.6. Statistical analysis.	157
4. Results and discussion.	158
4.1. Comparison of 1547 cell elution using two different SdFFF devices.....	158
4.2. Pre-apoptotic sub-population cell sorting by SdFFF.	162
5. Conclusion.	170
6. Acknowledgements.	170
B. Discussion / Conclusion.	171

ETUDE DE LA LIGNÉE NEUROBLASTIQUE IMR-32.....	173
A. Study of the phenotypic relationship in the IMR-32 human neuroblastoma cell line by Sedimentation Field Flow Fractionation.....	175
1. Abstract.....	175
.....	176
2. Introduction.....	176
3. Materials and methods.....	179
3.1. Cell line, cell culture and light microscopy.....	179
3.2. SdFFF device and cell elution conditions.....	179
3.3. Immunofluorescence assays.....	180
3.4. BrdU incorporation analyses.....	181
4. Results.....	182
4.1. Characterization of the IMR-32 cell lineage by immunocytofluorescent assays.....	182
4.2. SdFFF elution and fraction collection.....	183
4.3. Cellular kinetics of the IMR-32 cell line.....	185
4.4. Contrast phase microscopy of eluted fractions.....	186
4.5. Characterization of IMR-32 eluted fractions after 72h culture.....	188
4.6. Kinetics of PSA-N-CAM and nestin expression and incorporation of BrdU in eluted fractions.....	188
5. Discussion.....	191
6. Acknowledgements.....	195
B. Etude de l'apoptose et de la différenciation sur les phénotypes cellulaires triés par SdFFF à partir de la lignée IMR-32.....	196
1. Tri des IMR-32 par SdFFF.....	196
2. Etude de l'effet apoptique de Fas Ligand par la méthode TUNEL.....	197
3. Etude de l'effet apoptotique du 7C11 par la méthode Annexine V/IP en cytométrie en flux.....	199
4. Observations microscopiques des effets induits par la diosgénine.....	200
4.1. Etude comparative des effets différenciants de la diosgénine et de la rosiglitazone.....	202
4.2. Résultats préliminaires des effets combinés de la rosiglitazone et de la diosgénine.....	206
C. Discussion / Conclusion.....	209
DISCUSSION GENERALE	212
CONCLUSIONS / PERSPECTIVES	223
BIBLIOGRAPHIE GENERALE.....	226
TABLE DES MATIERES	264

Je dédie cette Thèse à Serge.

Résumé. L'utilisation de la technique de Fractionnement par couplage Flux Force de Sédimentation (SdFFF) dans le domaine de l'oncologie et particulièrement de la neuro-oncologie s'inscrit dans l'étude de la dynamique de populations complexes (ostéosarcome, neuroblastome) et des phénomènes de différenciation et d'apoptose. Ces applications reposent sur le concept novateur de "cellulomique" basé sur le couplage de l'efficacité du tri cellulaire par SdFFF et de la caractérisation des propriétés biologiques de sous-populations d'intérêt.

Une première approche de la SdFFF concernant le suivi de phénomènes biologiques a été menée sur les amidons. Leur dégradation enzymatique par des amylases représente l'une des plus importantes réactions mises en œuvre dans l'industrie agroalimentaire. Les travaux réalisés sur l'amidon de riz et de blé ont montré une corrélation entre la cinétique de dégradation et l'évolution des profils d'éluion de l'amidon (fractogrammes). La collection de fraction a également permis d'établir une corrélation entre la variation des propriétés biophysiques des particules éluées (taille, densité) et le mécanisme de réactions enzymatiques. Ainsi après cette étape de calibration, la SdFFF apparaît comme un outil permettant, par le simple enregistrement des fractogrammes, le suivi de réactions biologiques telle que l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses 1547 (ostéosarcome humain) traitées par un agent apoptotique d'origine végétale, la diosgénine. La SdFFF a également permis l'isolement de cellules pré-apoptotiques. Ce tri cellulaire, rapide (quelques minutes), sans marquage et de grande sélectivité améliore ainsi la spécificité et la sensibilité des tests biologiques utilisés pour l'étude des mécanismes impliqués au cours de l'apoptose.

Après le suivi d'évènements biologiques, le tri de sous-populations d'intérêt, le troisième point d'application de la SdFFF en oncologie a consisté à l'exploration de l'écologie de la population cellulaire IMR-32 (neuroblastome humain). Deux phénotypes de cellules neuroblastiques ont été isolés et ont permis la compréhension de la cinétique de différenciation et de la relation qui existe entre les cellules neuroblastiques immatures et les cellules fibroblastiques différenciées au sein de cette lignée. Enfin ces phénotypes isolés ont servi de modèles d'étude pour tester les effets d'agents apoptotique, la diosgénine et différenciant, la rosiglitazone dans le but de trouver des stratégies thérapeutiques efficaces sur ces cancers fortement résistants aux thérapies actuelles.

Abstract. The use of the Sedimentation Field Flow Fractionation (SdFFF) technology in the field of oncology, and particularly in the neuro-oncology registers, is now implicated in the study of the dynamics of complex populations (osteosarcoma, neuroblastoma) and differentiation or apoptosis phenomena. These studies lie on the new concept of "cellulomic" based on the hyphenation of SdFFF cell sorting and the biological characterization of interesting sub-populations. The first approach of SdFFF was performed with the monitoring of biological events in starch populations. Enzymatic starch granule amylosis is one of the most important reactions in food and pharmaceutical industrial processes. Studies on wheat and rice starches demonstrated a correlation between fractogram changes and enzymatic hydrolysis.

These results showed the interest in coupling SdFFF sub-population sorting with particle size measurement methods to study starch size/density modifications associated to hydrolysis. After this first step of calibration, SdFFF proved to be a fast, practical and specific method to monitor biological events. This was extend to the study of diosgenin (plant steroid) induced apoptosis of 1547 osteosarcoma cells. Moreover, SdFFF was used, for the first time, to perform the isolation of pre-apoptotic cells. This pre-apoptotic sub-population which is in an early stage of apoptosis could be used as cellular models for the study of diosgenin induced apoptotic kinetics. This fast, tagless and very selective method also increases specificity and sensibility of biological tests used to study apoptotic mechanisms.

After the monitoring of biological events, the sorting of specific sub-populations of interest, the third SdFFF application in oncology consisted in the study of the ecology or the phenotypical relationship in the complex IMR-32 cell line, used as a model of neuroblastoma. These cell lines have a great clinical and biological heterogeneity which affects response to treatment and patient outcome. For the first time, two phenotypes of neuroblastic, N-type, cells have been sorted by SdFFF, and allowed the understanding of differentiation kinetics and the relationship which exists between N-type and differentiated, S-type, cells. Finally, these isolated phenotypes were used as cellular models to test specific responses to apoptotic inducers, Fas ligand or diosgenin and differentiating inducers, retinoic acid or rosiglitazone in order to find new effective therapeutic strategies for these tumors actually resistant to chemotherapies.