

Université de Montréal

**L'implication de l'autophagie dans la chimiorésistance
du neuroblastome et l'intérêt de son inhibition**

par

Assila Belounis

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en Pathologie et Biologie Cellulaire

Septembre 2013

© Assila Belounis, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

L'implication de l'autophagie dans la chimiorésistance du neuroblastome et l'intérêt de son
inhibition

Présenté par :

Assila Belounis

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean-Marie Leclerc, président-rapporteur

Dr. Hervé Sartelet, directeur de recherche

Dr. Christian Beauséjour, membre du jury

Résumé

Le neuroblastome (NB) est une tumeur fréquente et agressive du jeune enfant. Les tumeurs de haut grade de forme métastatique, généralement développées chez l'enfant de plus de 1 an, sont associées à une importante mortalité malgré un traitement lourd incluant une chimiothérapie à haute dose. La chimiorésistance est donc un problème majeur qui caractérise ces NB de haut grade. Une des hypothèses pour expliquer cette chimiorésistance est celle de l'activation de l'autophagie, un mécanisme auquel recourent les cellules afin de faire face aux situations de stress. D'ailleurs, plusieurs études ont démontré que l'autophagie était activée à la suite des thérapies anticancéreuses. Son inhibition pourrait donc représenter une stratégie thérapeutique très intéressante pour le traitement de cancers. Le but de ce projet de recherche a été de mettre en évidence l'importance de l'autophagie dans les cellules du NB ainsi que l'effet de son inhibition sur la sensibilité des cellules du NB à la chimiothérapie conventionnelle.

La présence d'autophagie dans les cellules de NB et sa valeur pronostic ont été évaluées par une étude immunohistochimique et par western blot sur 184 tumeurs patient. Ensuite, dans le but de déterminer l'effet de la chimiothérapie conventionnelle sur le niveau d'autophagie, des études *in vitro* sur 6 lignées cellulaires ont été effectuées utilisant des tests de mesure d'autophagie (MDC, monodanylecadaverine), de viabilité cellulaire (MTT) et de western blot. Celles-ci ont été suivies par des tests d'inhibition de l'autophagie par deux méthodes: l'inactivation du gène *ATG5* par un lentivirus contenant un shRNA ciblant *ATG5* ou de l'hydroxychloroquine (HCQ), un inhibiteur pharmacologique de l'autophagie. Cette inhibition a été testée seule ou en combinaison avec une chimiothérapie conventionnelle dans le but de déterminer le rôle de l'autophagie dans la sensibilisation des cellules de NB à la chimiothérapie. Ensuite, l'intérêt de l'inhibition de l'autophagie a été évalué sur des modèles murins. Enfin, le niveau d'autophagie a été testé dans des cellules souches de NB.

Notre étude a démontré que l'autophagie est présente à un niveau basal dans une majorité des NB mais qu'elle ne représentait pas un facteur pronostic dans ce type de tumeur. Les différentes chimiothérapies testées induisent une augmentation de l'autophagie dans les cellules du NB. Les deux tests d'inhibition ont démontré *in vitro* que l'autophagie participe à la résistance des cellules aux traitements chimiothérapeutiques classiques du NB. Le blocage de l'autophagie *in vivo* augmente l'efficacité de la chimiothérapie, cependant certaines données associées au traitement par HCQ devront être complétées.

Cette étude démontre que l'inhibition de l'autophagie en combinaison avec la chimiothérapie classique représente une approche thérapeutique prometteuse dans le traitement du NB.

Mots-clés : Neuroblastome, autophagie, chimiorésistance, *ATG5*, HCQ

Abstract

Neuroblastoma (NB) is a common tumor in childhood. Despite major advances in treatments, NB still have a poor prognosis with 40% of mortality. Chemoresistance is a major issue that characterizes aggressive NB. This is a consequence of an autophagic mechanism that tumor cells use to overcome stressful situations encountered during treatments. Autophagy has been the subject of several studies showing its activation in response to anticancer therapies. Its inhibition may therefore represent a very interesting therapeutic strategy for cancer treatment. The purpose of this research was to determine the presence of autophagy in NB cells and the effect of autophagy inhibition in sensitizing NB cells to conventional chemotherapy.

The presence of autophagy was verified in 184 NB tumors. To determine the effect of conventional chemotherapy on autophagy, the MTT cell viability test and the autophagy measurement test (MDC, monodansylcadaverine) have been used to study 6 NB cell lines *in vitro*. An immunohistochemical study also allowed the verification of autophagy activation in tumors grown in mouse models. A lentivirus containing a shRNA against ATG5 was used to generate autophagy deficient cells. Using the MTT and MDC tests, we assessed their sensitivity to chemotherapy. In order to determine the effect of HCQ in sensitizing NB cells to chemotherapy, we used HCQ alone or in combination with conventional chemotherapy.

This study demonstrated that autophagy is present at a basal level in NB cells. Unlike for LC3, the results showed that Beclin 1 is a factor of poor prognosis. The MTT and MDC tests have shown that vincristine, doxorubicin, cisplatin, temozolomide, rapamycin, and LY294002 induce autophagy in NB cells. Also, immunohistochemical studies showed that cisplatin treatment increased autophagy *in vivo* in xenograft model of human NB in mice. ATG5 deficient cells showed greater sensitivity to chemotherapy. Furthermore, the use of these cells in mouse models showed an important role of autophagy in tumor progression as well as an increased sensitivity to vincristine. Finally, combination of HCQ with conventional chemotherapy showed an increased sensitivity of NB cells to chemotherapy compared to cells receiving chemotherapy only.

This study demonstrates that inhibition of autophagy in combination with conventional chemotherapy is an attractive therapeutic approach for the treatment of NB.

Keywords: Neuroblastoma, autophagy, chemoresistance, HCQ.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et des abréviations	ix
<i>Remerciements</i>	xiii
Introduction	1
Chapitre 1 : Le neuroblastome	1
1.1 Le développement du neuroblastome	1
1.2 Épidémiologie	3
1.3 Présentation clinique du NB	3
1.4 Diagnostic	4
1.5 Facteurs pronostiques	5
1.5.1 Facteurs pronostiques cliniques	7
1.5.2 Facteurs pronostiques histologiques	9

1.5.3. Facteurs pronostiques biologiques	11
1.6 Traitements	14
1.6.1 Traitements actuels	14
1.6.2 Les nouveaux agents thérapeutiques.....	16
1.6.3 Récurrence et chimiorésistance.....	18
Chapitre 2 : Autophagie.....	19
2.1 L'autophagie.....	19
2.2 Les différents types d'autophagie.....	19
2.3 Mécanisme.....	20
2.4 La régulation de l'autophagie.....	23
2.4.1 Les voies de régulation de l'autophagie	23
2.4.2 Les protéines ATG.....	25
2.5 Les rôles de l'autophagie	26
2.5.1 Autophagie cytoprotectrice	26
2.5.2 Autophagie et mort cellulaire	26
2.6 Autophagie et cancers	27
2.6.1 Autophagie : mécanisme de suppression tumorale (effet anti-tumoral)....	28
2.6.2 Autophagie : mécanisme de survie tumorale (effet pro-tumoral).....	29

2.7 Autophagie et chimiothérapie.....	31
2.8 Les inhibiteurs d'autophagie	32
2.8.1 Hydroxychloroquine	33
Chapitre 3 : Cellules Souches Cancéreuses (CSCs)	34
3.1 Concept des CSCs.....	34
3.1 Les modèles stochastique et hiérarchique des CSCs	34
3.2 Les marqueurs des CSCs.....	35
3.2.1 CD133	35
3.3. CSCs et chimiorésistance	36
Chapitre 4 : Projet de recherche	38
4.1 Objectifs de recherche.....	38
4.2 Stratégie expérimentale	39
Chapitre 5: Matériel et méthodes.....	40
5.1 Lignées cellulaires de NB	40
5.2 Cytométrie de flux	40
5.3 Extraction protéique et immunobuvardage	41
5.4 Études in vivo	41
Chapitre 6: Article	43

Chapitre 7: Résultats	92
7.1 Résultats de l'article p.46 à 93.....	92
7.2 L'effet de HCQ sur la progression tumorale in vivo	92
7.3 Évaluation du niveau d'autophagie dans les cellules souches du NB.	94
Discussion.....	95
Conclusion	104
Perspectives	105
Bibliographies	106

Liste des tableaux

Tableau I : Stratification des groupes de risque par stade.....	6
Tableau II : Les stades du NB selon l'INSS	8
Tableau III : Stratification selon l'histopathologie de la tumeur: INPC	10
Tableau IV: Corrélation entre le stade du NB et l'amplification de <i>MYCN</i>.....	13
Tableau V : Les protéines ATG et leurs fonctions.....	25
Tableau VI : Inhibition d'autophagie et chimiothérapie.....	32
Tableau VII : CD133 marqueur de CSCs dans plusieurs cancers.....	36
Tableau VIII : Effet d'HCQ sur la sensibilisation de la tumeur à la vincristine <i>in vivo</i>	93

Liste des figures

Figure 1 : Le développement de la crête neurale.	2
Figure 2 : Imagerie par metaiodobenzylguanidine (MIBG).	5
Figure 3 : Le NB varie dans le degré de différenciation.	9
Figure 4 : Amplification du gène <i>MYCN</i> démontrée par hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (<i>FISH</i>).	12
Figure 5 : Autophagie sélective et non sélective.	20
Figure 6: Mécanisme de l'autophagie et ses voies de régulation.	22
Figure 7 : Rôle de l'autophagie dans la suppression tumorale.	29
Figure 8 : Rôle de l'autophagie dans la survie et l'agressivité de la tumeur.	30
Figure 9 : Effet d'HCQ seule ou en combinaison avec la vincristine sur la progression tumorale <i>in vivo</i>	93
Figure 10 : Niveau d'expression de LC3II dans les CSCs du NB.	94

Liste des sigles et des abréviations

ALK: Anaplastic Lymphoma Kinase

AML: Acute myeloid leukemia/ Leucémie myéloïde aigue

ATCC: American type tissue culture collection

ATG: Autophagy related genes

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor / Facteur neurotrophique dérivé du cerveau

Ch14.18: Anticorps monoclonal chimérique 14.18

CIS: Cisplatin

CN: Crête neurale

COG: Children's Oncology Group / Groupe d'oncologie pédiatrique

CQ: Chloroquine

CSC: Cancer stem cells / Cellules souches cancéreuses

DOPA: Dopamine

DOXO: Doxorubicine

DRAM: Damage-regulated autophagy modulator

ERO: Espèces réactives de l'oxygène parmi lesquelles se trouvent des radicaux libres (comme $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{RO}_2\cdot$), ainsi que des produits non radicalaires (comme H_2O_2 , RO_2H).

FAAD: Fas-associated death domain /

FISH: Fluorescence in situ hybridization

GD2: Disialoganglioside

GM-CSF: Granulocyte macrophage colony stimulating factor / Facteur stimulant des colonies de granulocytes et macrophages

GN: Ganglioneurome

GNB: Ganglioneuroblastome

HCQ: Hydroxychloroquine

HDAC: Histone déacétylase

HVA: Acide homovanillique

IFN γ : Interferon gamma / Interféron gamma

IL-2: Interleukine-2

INPC: International Neuroblastoma Pathology Classification/ Système de classification international de la pathologie du neuroblastome

INRGSS: International Neuroblastoma Risk Group Staging System / Système de starification international des groupes de neuroblastomes à risques

INSS: International Neuroblastoma Staging System / Système de starification international du neuroblastome

IR: Irradiation ionisante

L1: Maladie localisée sans facteurs de risque définis par image

L2: Maladie localisée avec facteurs de risque définis par image

LC3: Microtubule-associated protein 1(MAP1)-light chain 3

LOH: Perte d'hétérozygotie

M: Tumeur métastatique

MDC: Monodansylcadaverine

MIBG: Meta-iodobenzylguanidine

MKI: L'index mitose-caryorrhexie

MNNG: N-methyl-N0-nitro-N-nitrosoguanidine

mRNA: ARN messenger

MS: La maladie métastatique "spéciales", où MS est équivalente au stade 4S. Tumeur métastatique avec métastases définies à la peau, au foie et/ou à la moelle osseuse chez des enfants de moins de 18 mois

mTOR: Mammalian target of rapamycin / cible de la rapamycine chez les mammifères

MYCN: v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog

NB: Neuroblastome

NGF: Neuronal growth factor / Facteur de croissance neuronal

NOD/SCID: Non-obese diabetic, severe combined immunodeficient / Non obèse et non diabétique, immunodéficient combine sévère

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

Rheb: Ras homolog enriched in brain

RNAi: ARN interférant

ROS: Reactive oxygen species/ Dérivés réactifs de l'oxygène

SNS: Système nerveux sympathique

TEM: Transition épithélio-mésenchymateuse

TSC: Tuberous sclerosis complex

VIN: Vincristine

VMA: Acide vanylmandélique

Aux enfants atteints de neuroblastome.

Remerciements

Ce fut un plaisir de travailler avec le Dr Sartelet que je tiens à remercier pour son soutien, ses encouragements, ses conseils et son éternel enthousiaste.

Je voudrais également remercier Dre Carine Nyalendo, pour ses précieux conseils ainsi que son soutien continu et son énorme générosité.

Je remercie également toutes les personnes formidables, collègues et amis qui ont permis que mon expérience au sein du laboratoire reste pour moi une expérience mémorable, enrichissante et marquante. Je pense à Sonia Cournoyer, Anissa Addioui, Ann-Hélène Conon, Rose-Marie Brito, Teresa Gomes, Cybil Abou-Rizk, Dominique Vidaroune, Marie-Michelle Beauchemin, Alexandre Benoit et Sarah Hadj-Mimoune.

Je remercie également mes amies et collègues Amel Kechad, Yvonne Ruella, et Massar Dieng pour leur soutien et au plaisir que j'ai eu à les voir à chaque jour.

À Mr Slim Bouzlama et Mr Abdellatif Boutefnouchet, deux personnes exceptionnelles qui m'ont initié à la recherche, pour leur soutien et leurs encouragements.

À mon époux, pour son amour et soutien inconditionnel.

A ma sœur Imen et ma maman, mes raisons de vivre, les personnes qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui, pour leurs amour, soutien, encouragements et sacrifices.

À toi papa..

Introduction

Chapitre 1 : Le neuroblastome

Le neuroblastome (NB) est une tumeur embryonnaire du système nerveux sympathique (SNS).¹ Elle se développe durant la vie fœtale ou postnatale à partir de cellules originaires de la crête neurale (CN) donnant normalement naissance à la médullosurrénale et aux ganglions sympathiques.² L'incidence de NB est de 10,5 par million d'enfants âgés de moins de 15 ans avec plus de 650 cas diagnostiqués en Amérique du Nord par année.³ C'est une tumeur très hétérogène sur le plan clinique et biologique⁴ allant d'une rémission spontanée ne nécessitant pas forcément une intervention thérapeutique à une progression rapide avec formation de métastases et ce malgré des thérapies multimodales très agressives.⁵ Avec l'émergence de l'immunothérapie dans le traitement du NB, le pourcentage de survie des patients avec un NB à haut risque s'est vu augmenté de 40 à 66%⁶ mais malgré ce progrès encourageant, de nombreux patients atteints de ce type de tumeur présentent des rechutes et développent une **chimiorésistance**. Il est par conséquent primordial de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de diminuer cette chimiorésistance et ainsi augmenter la survie des patients atteints de NB.

1.1 Le développement du neuroblastome

Le NB dérive des cellules de la CN.¹ Ces dernières sont normalement à l'origine des cellules nerveuses immatures qui vont former le SNS. Générée à partir de la zone dorsale du tube neural, la CN est formée par une population cellulaire transitoire et multipotente spécifique aux vertébrés.⁷ Elle se forme à la suite de l'étape de gastrulation du développement embryonnaire et se localise à la jonction entre la plaque neurale et l'ectoderme (Figure 1). Les cellules de la CN subissent alors une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) qui permettra le détachement et la migration d'une population cellulaire particulière.⁸ Elles migrent vers diverses régions de l'embryon et donnent naissance à une grande diversité de types cellulaires dont les neurones périphériques, les cellules gliales du système nerveux sympathique, parasymphatique et sensoriel, les cellules

du tissu conjonctif, les mélanocytes, les cellules musculaires lisses et les cellules endocrines.^{9,10}

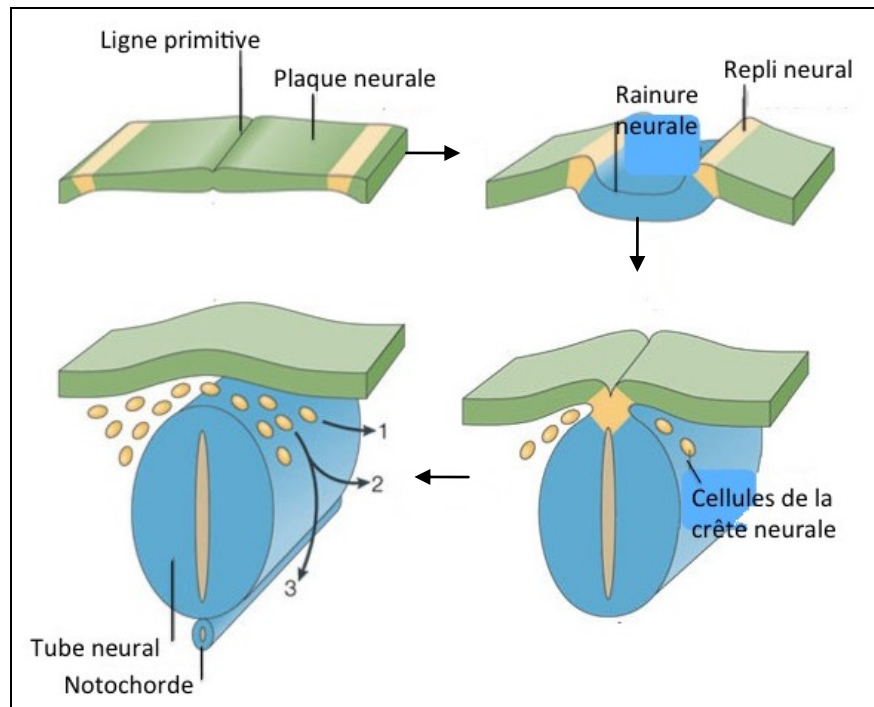


Figure 1 : Le développement de la crête neurale.

La crête neurale (jaune) se trouve initialement sur les extrémités de la plaque neurale (vert). La plaque neurale se replie sur elle-même. Une fois que le tube neural (bleu) se referme, les cellules de la crête neurale subissent une TEM et vont migrer vers l'ensemble de l'embryon. *Illustration adaptée de Kristjan R. Jessen & Rhona Mirsky, 2005.*

Les cellules de la CN sont, au départ, des cellules souches multipotentes mais leur capacité de différenciation diminue au fur et à mesure qu'elles migrent. Ainsi, lorsqu'elles s'éloignent du tube neural, elles acquièrent une différenciation unique, dépendamment de leur direction de migration.¹¹ Elles peuvent être différenciées et matures (ex : les cellules ganglionnaires) ou demeurer peu différenciées et immatures (ex : les neuroblastes). Le NB se développe lorsqu'il y a une mutation génétique ou épigénétique des gènes impliqués dans le développement et la différenciation des cellules de la CN.¹² Le NB prend donc

naissance à partir du SNS et ainsi il peut se développer au niveau du cou, du thorax, des glandes surrénales, de l'abdomen, ou du pelvis.

1.2 Épidémiologie

Au Canada, on compte environ 65 nouveaux cas de NB chaque année. Quarante-vingt-dix pour cent des NB sont diagnostiqués chez les enfants de moins de cinq ans.¹³ Le NB est le troisième cancer le plus fréquent chez l'enfant, précédé des leucémies (myéloïdes aiguës et lymphoblastiques aiguës) et des cancers du système nerveux central comme le glioblastome. Par contre, chez l'enfant de moins de 1 an, le NB est la tumeur la plus fréquente. Globalement, le NB représente 8% des cancers pédiatriques.^{1,11}

L'âge médian du diagnostic est à 15 mois et son incidence est estimée à 1 sur 100 000 naissances au Canada, avec des taux équivalents ou légèrement plus élevés chez les garçons que chez les filles. De plus, dans 5% des cas, on retrouve une association entre le NB et des malformations congénitales telles que le syndrome Beckwith-Wiedemann, le syndrome de Von Recklinghausen, la maladie de Hirschsprung, le syndrome Rubenstein-Taybi ainsi que certaines malformations congénitales cardiaques.¹⁴⁻¹⁹

1.3 Présentation clinique du NB

Comme nous l'avons vu, le NB se développe à partir du SNS. La majorité des tumeurs primaires (65%) apparaissent au sein de l'abdomen dont la moitié prennent naissance dans la médullosurrénale. Les autres localisations se trouvent être le cou (5%), le thorax (20%) ou le pelvis (5%).²⁰ Le développement de symptômes cliniques sont très variables dépendamment du site ou du stade de la tumeur primaire, la présence ou l'absence de métastases ou de syndromes paranéoplasiques.²¹ En effet, certains patients sont asymptomatiques, alors que d'autres présentent des signes cliniques comme des malaises, de la fièvre, une perte de poids, des douleurs ou une apparition d'une masse abdominale.²²

En raison de son hétérogénéité, on peut noter trois évolutions distinctes de la maladie : une progression rapide menant au décès du patient malgré des traitements

agressifs (comprenant une chimiothérapie à haute dose et une greffe de moelle osseuse), une tumeur agressive mais contrôlable par un traitement associant chirurgie et chimiothérapie, ou une maturation en une tumeur bénigne appelée ganglioneurome (GN) voir même une régression spontanée.¹⁴

1.4 Diagnostic

En plus des éléments cliniques, le diagnostic initial du NB repose sur des tests urinaires pour évaluer le niveau des catécholamines ou de leurs métabolites (dopamine, acide vanylmandélique (VMA) et l'acide homovanillique (HVA)). Cependant, environ 10% des NB présentent des taux de catécholamines urinaires normaux. Les tests urinaires ont aussi une valeur prédictive de l'agressivité de la tumeur. Par exemple, les NB de haut grade sont caractérisés par une diminution accrue de la dopamine-bêta hydroxylase, une enzyme qui convertie la dopamine (DOPA) en noradrénaline (NORA) et l'on retrouve alors une excrétion urinaire anormalement élevée de DOPA et HVA²³ Comme les tests urinaires sont relativement simples, un programme de dépistage systématique du NB a été proposé dans le but de diminuer l'incidence des stades avancés et donc de la mortalité associée à cette tumeur. Même s'il fut pour la première fois accompli au Japon^{24,25}, un dépistage systématique du NB a également été réalisé au Québec sur une grande cohorte d'enfants à la naissance et à 6 mois de vie. Au total, ces études ont démontré que le dépistage du NB avant l'âge de 1 an mettait plutôt en évidence des tumeurs de bon pronostic et ne permettait pas d'identifier les cas de mauvais pronostic.^{20,26}

En ce qui concerne le diagnostic radiologique, la tomographie constitue un excellent moyen de localiser la tumeur et d'en déterminer l'étendue. L'échographie peut être initialement utilisée afin de caractériser la masse tumorale. La scintigraphie à la mIBG (méta-iodobenzylguanidine), est plutôt utilisée pour confirmer le diagnostic. La mIBG est une molécule analogue à la noradrénaline qui peut être radiomarquée par l'iode 123. Elle peut alors servir à localiser la lésion tumorale et les métastases mais aussi à la surveillance de la réponse aux traitements ainsi qu'au diagnostic des récives (Figure 2). Cependant, malgré les avancements en matière de diagnostic du NB, celui-ci ne peut être confirmé que par l'examen en pathologie effectué sur des tissus provenant de la tumeur ou de la moelle

osseuse. Des tests moléculaires, comme la FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) sont réalisés afin de vérifier la ploïdie, la présence ou non de l'amplification de *MYCN* (voir section 1.5.3) ainsi que d'autres aberrations chromosomiques (voir plus loin 1.5.3.1 Facteurs génétiques).²²

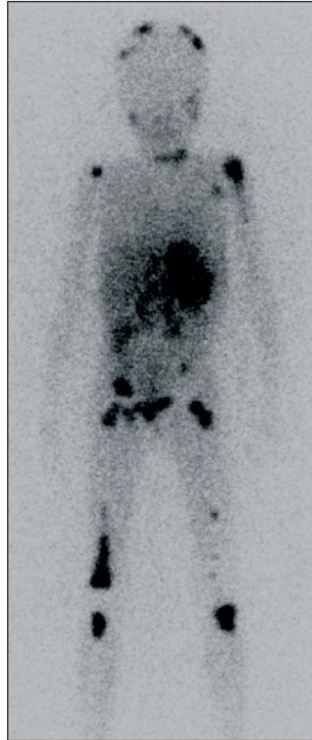


Figure 2 : Imagerie par metaiodobenzylguanidine (MIBG).

La présence de marquage due à l'absorption du radio-traceur peut être observée dans plusieurs sites, y compris les os et les tissus mous. *Illustration adaptée de J. M Maris, M. D Hogarty et al, 2007*

1.5 Facteurs pronostiques

Vu le caractère hétérogène de la tumeur, différents critères cliniques comme l'âge du patient ainsi que le stade de la tumeur au moment du diagnostic ont été définis comme des facteurs pronostiques majeurs. Ces facteurs pronostiques sont utilisés afin d'évaluer le risque de progression de la maladie et permettent de choisir la meilleure approche thérapeutique à entreprendre pour le patient. A ces critères cliniques, s'ajoutent des critères histologiques et biologiques qui s'avèrent également importants. En effet, les patients atteints de NB sont classés en groupes de risques (risque faible, risque intermédiaire, haut

risque) qui tiennent compte de données cliniques, biologiques et pathologiques de la tumeur (Tableau I).²² Les patients à faible risque ont une probabilité de survie de 80% à 90% parfois associée une régression spontanée de la tumeur.^{27,28} Les patients à risque intermédiaire présentent un taux de survie qui excède 80% après chirurgie et chimiothérapie.²⁹ Quant aux patients à haut risque, seulement 30 à 40% d'entre eux survivent à long terme malgré des traitements lourds associant chimiothérapie, radiothérapie et greffes de cellules souches hématopoïétiques.³⁰ Récemment, l'ajout d'une immunothérapie ciblée (traitement constitué d'anticorps humanisés anti-GD2, IL2 et GM-CSF, détails page 16) a permis d'atteindre un taux de survie à long terme de 66%.⁶ De plus, les NB de haut risque ont un taux de rechute élevé en raison de la résistance à la chimiothérapie des cellules tumorales.¹

Tableau I : Stratification des groupes de risque par stade

INSS	Âge	MYCN	Ploïdie	Histologie	Autre	Groupe de risque
1						Faible
2A/2B		Non-amplifié			>50% résection	Faible
		Non-amplifié			<50% résection	Intermédiaire
		Non-amplifié			Biopsie seulement	Intermédiaire
		Amplifié				Haut
3	< 547 jours	Non-amplifié				Intermédiaire
	≥ 547 jours	Non-amplifié		Favorable		Intermédiaire
		Amplifié				Haut
	≥ 547 jours	Non-amplifié		Défavorable		Haut
4	<365 jours	Amplifié				Haut
	<365 jours	Non-amplifié				Intermédiaire
	365-547 jours	Amplifié				Haut
	365-547 jours		DI-1			Haut
	365-547 jours			Défavorable		Haut
	365-547 jours	Non-amplifié	DI>1	Favorable		Intermédiaire
	≥547 jours					Haut
4S	<365 jours	Non-amplifié	DI>1	Favorable	Asymptomatique	Faible
	<365 jours	Non-amplifié	DI-1			Intermédiaire
	<365 jours	Non spécifié	N.S.	Non spécifié		Intermédiaire
	<365 jours	Non-amplifié			Symptomatique	Intermédiaire
	<365 jours	Non-amplifié		Défavorable		Intermédiaire
	<365 jours	Amplifié				Haut

INSS : *International Neuroblastoma Staging System*

Les patients âgés de moins de 1 an ou ceux ayant un MYCN non-amplifié représentent le groupe à faible risque. N.S.: Non spécifié. *Tableau adapté du Children's Oncology Group.*

1.5.1 Facteurs pronostiques cliniques

Le stade de la maladie: les métastases

Le système de stratification international du NB (INSS : *International Neuroblastoma Staging System*) a été longtemps utilisé. Il permet d'identifier quatre groupes pronostiques définis en fonction de l'extension loco-régionale de la tumeur primaire, la présence ou non de métastases ainsi que leur localisation, soient les stades 1, 2A, 2B, 3, 4 et 4S (Tableau II).²¹ Environ la moitié des patients présentent des métastases au moment du diagnostic principalement de localisation hépatique, cutané et ganglionnaire et très rarement au niveau des méninges, des poumons et du cerveau.³¹ Exceptionnellement, le NB a tendance à former des métastases au niveau des orbites donnant l'apparence d'ecchymoses autour des yeux (yeux de raton laveur).²¹ Les stades 1 et 2 (2A et 2B) représentent les tumeurs localisées sans métastase ganglionnaire (stade 1) ou avec métastases ganglionnaires (stade 2). Le stade 3 est un stade intermédiaire constitué d'une tumeur primitive de grande taille non résécable ou dépassant la ligne médiane avec ou sans métastases ganglionnaires lymphatiques. La présence de métastases retrouvées en dehors des ganglions lymphatiques est associée au stade 4 et à un mauvais pronostic. Enfin, on décrit un stade 4S (S: Spéciale) spécifique du NB. Il est retrouvé chez les enfants de moins de 6 mois avec des métastases cutanées, hépatiques (massives ou non) et dans la moelle osseuse. Ce stade 4S est associé à un bon pronostic.²³ En résumé, on parle de tumeur de bas grade pour les stades 1, 2 ou 4S alors que les stades 3 ou 4 sont considérés comme des tumeurs de haut grade (Tableau II).

En 2005, un nouveau système a été proposé en vue d'une classification plus uniforme et éviter par conséquent des approches de stratification variables. En effet, le nouveau système de stratification INRGSS (*International Neuroblastoma Risk Group Staging System*) a été établi à partir de l'analyse de 11 054 tumeurs de patients qui ont été

traités en Europe, aux États-Unis, au Japon, au Canada et en Australie entre 1974 et 2002.^{3,32} Selon l'INRG, l'étendue de la maladie sera définie par l'imagerie et l'analyse de la moelle osseuse. Les caractéristiques radiologiques sont utilisées afin de distinguer les tumeurs localisées sans invasion locale et donc résecable d'emblée (stade L1 - INRG) et les tumeurs localement invasives et donc non résecable d'emblée (stade L2 - INRG). Les stades M et MS désignent respectivement les tumeurs métastatiques ou les tumeurs 4S de la classification INSS (voir plus haut).

Tableau II : Les stades du NB selon l'INSS

- 1 Tumeur localisé avec exérèse complète avec ou sans maladie résiduelle microscopique; et des ganglions lymphatiques ipsilatéraux négatifs pour la tumeur au microscope (les ganglions attachés et enlevés avec la tumeur primaire peuvent être positifs)
- 2A Tumeur localisée avec exérèse incomplète; les ganglions lymphatiques non adhérents ipsilatéraux sont négatifs pour la tumeur au microscope
- 2B Tumeur localisée avec ou sans exérèse complète, avec des ganglions lymphatiques ipsilatéraux non adhérents positifs pour la tumeur. Les ganglions lymphatiques controlatéraux doivent être négatifs au microscope
- 3 Tumeur unilatérale non résequable dépassant la ligne médiane, avec ou sans envahissement des ganglions lymphatiques; ou tumeur localisée unilatérale avec envahissement des ganglions lymphatiques contralatéraux; ou tumeur dépassant la ligne médiane avec extension bilatérale (non résequable) ou des ganglions lymphatiques envahis
- 4 Toute tumeur primaire avec dissémination à distance aux ganglions lymphatiques, os, moelle osseuse, foie, peau ou autres organes (excepté stade 4S)
- 4S Tumeur primaire localisée chez l'enfant de moins de 1 an, avec dissémination limitée à la peau, au foie ou à la moelle osseuse (<10% cellules malignes)

Classification des stades cliniques du NB en fonction du caractère localisé ou métastatique de la tumeur. *Tableau adapté de J. M Maris, M. D Hogarty et al, 2007*

L'âge

L'âge du patient au moment du diagnostic est un facteur pronostique très important. Plus l'enfant est jeune, plus les probabilités de survie du patient sont bonnes. En effet, un âge seuil de 12 mois été utilisé traditionnellement comme facteur de classification des groupes à risque.³³ Cependant les données collectées de l'analyse de 3 666 patients atteints de NB suggèrent que ce seuil est trop bas et qu'un seuil entre 15 et 18 mois serait un indicateur clinique plus pertinent.³⁴ D'autres études ont montré que les patients entre 12 et 18 mois avec des tumeurs de stade 4 sans amplification de gène MYCN avaient un meilleur pronostic que ce qui avait été rapporté précédemment.^{35,36} Ainsi, les enfants de moins de 18 mois présentent plutôt un pronostic favorable avec des tumeurs localisées (stade 1 et 2) alors que les patients de plus de 18 mois présentent souvent des tumeurs métastatiques (stade 3 et 4) associées à un très mauvais pronostic (Tableau II).

1.5.2 Facteurs pronostiques histologiques

Une classification liée aux caractéristiques histopathologiques de la tumeur a été développée en 1984. Ce nouveau critère, connu aujourd'hui sous le nom de la classification histopronostique de Shimada, classe les tumeurs en favorables ou non-favorables en fonction du degré de la différenciation des neuroblastes (Figure 3), l'index mitose-caryorrhexie (MKI) ainsi que l'âge des patients au moment du diagnostic.³⁷

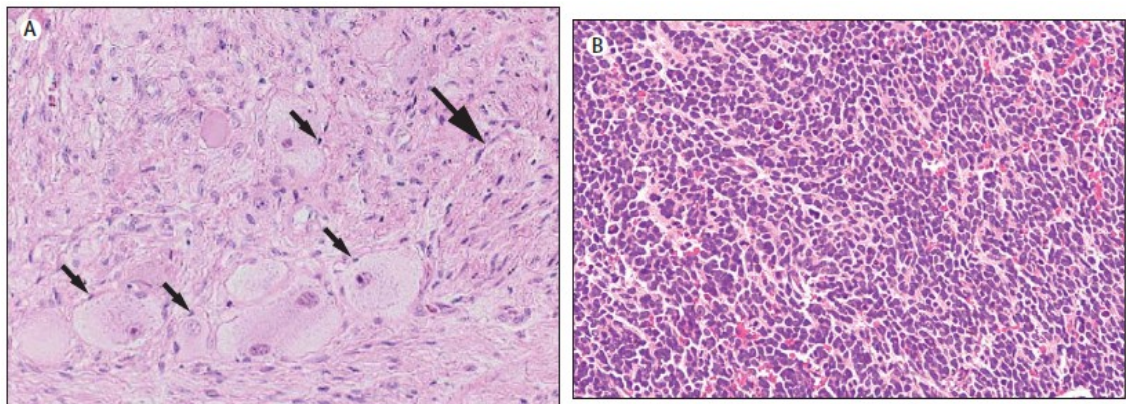


Figure 3 : Le NB varie dans le degré de différenciation.

(A) Cellules Schwanniennes (grande flèche) et cellules ganglionnaires (petite flèche) caractéristiques de NB riche en stroma. **(B)** NB stroma pauvre composé de cellules

contenant de petits noyaux ronds et bleus avec chromatine condensée et un cytoplasme peu abondant. *Illustration adaptée de J. M Maris, M. D Hogarty et al, 2007*

Par la suite, un système de classification international, INPC (*International Neuroblastoma Pathology Classification*), est venu apporter des modifications au système Shimada.³⁸ Cette nouvelle approche, permet de distinguer quatre morphologies tissulaires différentes en fonction de leur contenu cellulaire soit le ganglioneurome (GN), le ganglioneuroblastome (GNB) mixte et nodulaire et le NB (Tableau III).³⁹ En effet, la présence unique de stroma Schwannien et de cellules matures ganglionnaires caractérise le GN, une tumeur bénigne. Une tumeur composée d'au moins 50% de stroma Schwannien mais aussi de neuroblastes sera identifiée comme étant un GNB mélangé sauf dans le cas où les neuroblastes se regroupent pour former un ou plusieurs nodules visibles macroscopiquement où dans ce cas, on l'appelle GNB nodulaire. Par contre, les tumeurs composées de moins de 50% de stroma Schwannien et majoritairement de neuroblastes, sont appelées NB. Ainsi, la présence de tissu immature dans le GNB et le NB laisse présager un comportement tumoral agressif bien que le GNB soit de bien meilleur pronostic.⁴⁰

Tableau III : Stratification selon l'histopathologie de la tumeur: INPC

Système de classification international de la pathologie du NB		Classification Shimada Originale	Groupe Pronostique
Neuroblastome	(Pauvre en stroma Schwannien)	Stroma pauvre	
Favorable		Favorable	Favorable
< 1.5 a	Tumeurs pauvrement différenciées ou différenciées avec MKI bas ou intermédiaire		
1.5 à 5 a	Tumeurs différenciées et MKI bas		
Non-Favorable		Défavorable	Défavorable
< 1.5 a	a) Tumeurs indifférenciées b) Tumeurs avec MKI élevé		
1.5 à 5 a	a) Tumeurs indifférenciées ou pauvrement différenciées b) Tumeurs avec MKI intermédiaire ou élevé		
≥ 5 a	Toutes les tumeurs		
Ganglioneuroblastome mixte	(Riche en stroma Schwannien)	Stroma riche mélangé (Favorable)	Favorable
Ganglioneurome	(Stroma Schwannien dominant)		
En voie de maturation		Bien différenciée (Favorable)	Favorable
Mature		Ganglioneurome	
Ganglioneuroblastome nodulaire	(Composé de stroma Schwannien riche, stroma dominant et stroma pauvre)	Stroma riche nodulaire (Non-Favorable)	Défavorable

Tableau adapté du International Neuroblastoma Pathology Classification

Ce tableau résume les critères essentiels qui nous permettent de différencier une tumeur d'histopronostique favorable et d'histopronostique défavorable. Ce critère histopronostique est essentiel pour définir les tumeurs de bas risque, risque intermédiaire et haut risque qui permettra l'administration d'un traitement adapté.

Le MKI désigne le pourcentage de cellules en division (mitose) et/ou de cellules qui présentent un noyau condensé et fragmenté (caryorrhexie). Ainsi, les patients ayant une tumeur indifférenciée ou avec un MKI élevé, tous âges confondus, sont classés dans le groupe à histologie défavorable. Ce groupe inclut également les tumeurs ayant un MKI intermédiaire ainsi que les tumeurs faiblement différenciées chez les patients de plus de 18 mois et les tumeurs différenciées ou un MKI bas chez les patients âgés de plus de 5 ans.⁴¹

1.5.3. Facteurs pronostiques biologiques

Si les facteurs cliniques et histologiques restent des facteurs essentiels pour évaluer le pronostic du NB, les facteurs biologiques ont une importance qui ne cesse d'augmenter. Ainsi, de plus en plus d'efforts sont en train d'être réalisés afin de mieux comprendre et évaluer la biologie de la tumeur.

Les neurotrophines, telles que les facteurs de croissance neuronaux (NGF : *Neuronal Growth Factor*) et les facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau (BDNF : *Brain-derived neurotrophic factor*) sont essentielles au développement du système nerveux central et périphérique. Elles activent leurs récepteurs TRK-A et TRK-B dont l'expression différentielle est un indicateur d'agressivité de la tumeur. Une surexpression de TRK-B est associée au NB de mauvais pronostic et à la chimiorésistance alors que l'expression de TRK-A est spécifique aux tumeurs à faible risque.⁴² En effet, TRK-B est fortement corrélée à l'amplification de *MYCN*. Trk-A serait responsable de la différenciation et la régression des NB à pronostic favorable.⁴³

1.5.3.1 Facteurs génétiques

La particularité biologique du NB réside dans les anomalies génétiques acquises par les cellules tumorales. En effet, l'amplification du gène *MYCN*, la ploïdie de l'ADN ou les aberrations retrouvées sur les allèles 1p, 11q ou 17q, sont des facteurs d'une grande importance pronostique.²

MYCN

Découvert en 1983, le proto-oncogène *MYCN* est l'un des plus puissants facteurs pronostiques biologiques du NB.^{44,45} L'amplification du gène *MYCN* qui se trouve à l'état normal sur le chromosome 2p24, est retrouvée dans environ 20 à 25% de l'ensemble des NB mais dans 40% des cas métastatiques et dans seulement 5 à 10% des cas localisés.⁴⁶ L'amplification de *MYCN* est définie par la présence de plus de 10 copies du gène par cellule. Elle peut être facilement évaluée par la technique FISH (Figure 4). Cette amplification de *MYCN* est donc associée à des stades avancés de la maladie mais aussi à une progression rapide de la tumeur et est un indicateur d'agressivité et de mauvais pronostic (Tableau IV).^{40,46,47}

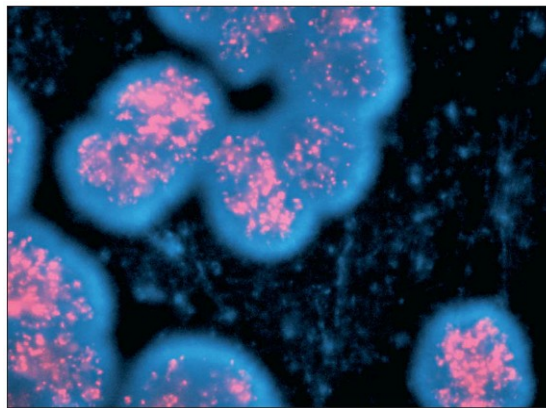


Figure 4 : Amplification du gène *MYCN* démontrée par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH).

La présence de copie du *MYCN* (points roses) peut être directement détectée dans les cellules tumorales par l'utilisation de sondes spécifiques marquées. *Illustration adaptée de J. M Maris, M. D Hogarty et al, 2007*

Tableau IV: Corrélation entre le stade du NB et l'amplification de *MYCN*

Stade au diagnostic	Amplification de <i>MYCN</i>	Survie à 3 ans
Ganglioneurome bénin	0%	100%
Stades 1 et 2	4%	90%
Stade 4S	8%	80%
Stades 3 et 4	31%	30%

Tableau adapté de Brodeur et al. 2003.

Gain du bras long du chromosome 17

Identifié en 1984, le gain du bras long du chromosome 17 est l'anomalie génétique la plus répandue dans le NB puisqu'il se produit dans plus de 70% des tumeurs.⁴⁸ Plusieurs études rétrospectives suggèrent qu'il est indépendamment associé à un mauvais pronostic. Il est très rare qu'une tumeur ait une amplification de *MYCN* ou une délétion 1p sans avoir un gain de 17q.⁴⁹

Les délétions alléliques 1p et 11q

La perte d'hétérozygotie (*LOH*) du chromosome 1 (1p) se produit dans 35% des NB et est très souvent corrélée à l'amplification du gène *MYCN*. Dans les cas de stades tumoraux avancés, on retrouve cette perte dans 70% des cas.⁵⁰ Même si la délétion de matériel génétique dans les tumeurs suggère la perte de gènes suppresseurs de tumeurs dans la zone délétée, aucun gène suppresseur de tumeur n'a été décrit pour le moment dans cette zone. Toutefois, de récentes données ont identifié un nouveau gène candidat dans la région 1p36.31, le *CHD5*; ce gène pourrait être un gène suppresseur de tumeur important dans le NB.⁵¹

La délétion du long bras du chromosome 11 (11q) semble également fréquente puisqu'elle est présente dans 40% des cas. Récemment, il a été démontré sur une grande cohorte de patients atteints de NB que les délétions de 11q et 1p36 étaient indépendamment associées au mauvais pronostic.⁵²

1.6 Traitements

L'approche thérapeutique à entreprendre pour le traitement du NB dépend essentiellement du risque associé à la tumeur (niveau de risque et stade de la tumeur). Ainsi, le traitement peut aller d'une simple surveillance à une association agressive de traitements anticancéreux. En effet, le traitement du NB à faible risque préconise le plus souvent l'excision chirurgicale de la tumeur et, plus rarement, aucune intervention mais un suivi régulier de l'évolution. Les NB de risque intermédiaire nécessitent souvent une chimiothérapie à dose minimale qui dépendra de l'évolution clinique et anatomique de la tumeur. En revanche, le NB à haut risque requiert un traitement intensif et très agressif incluant une chirurgie, une chimiothérapie néo-adjuvante, une chimiothérapie myéloblastive avec thérapie cellulaire ainsi qu'une radiothérapie. Le taux de survie n'est que de 40%.⁵³ Toutefois, ce pourcentage s'est amélioré ces dernières années à 66% grâce à l'immunothérapie (traitement constitué d'anticorps humanisé anti-GD2, IL2 et GM-CSF, détails page 16).⁶ Néanmoins, les traitements préconisés aux enfants présentant un NB métastatique restent très lourds d'où la nécessité d'explorer de nouvelles voies thérapeutiques moins agressives et surtout efficaces chez les patients réfractaires aux traitements actuels.

1.6.1 Traitements actuels

Le traitement de NB à faible risque

Le traitement principal des NB à faible risque repose essentiellement sur la résection chirurgicale. Elle a pour but une ablation complète de la tumeur. Cependant, en fonction de la localisation, de l'invasion et de la taille de la tumeur, la chirurgie n'est pas toujours complète et peut laisser en place, soit des résidus microscopiques (stade 1), soit d'importants résidus macroscopiques (stade 2A) ou enfin d'importants résidus avec invasion des ganglions lymphatiques ipsilatéraux (stade 2B).²²

Totalement à part, les enfants qui présentent un NB de stade 4S, ne doivent subir que des biopsies pour déterminer le statut génétique associé. Si la tumeur présente des

facteurs biologiques favorables, la prise en charge est uniquement une observation sans traitement chirurgical.²

Le traitement des NB à risque intermédiaire

Pour les patients qui présentent une tumeur de risque intermédiaire associée à de bons facteurs pronostics, on assiste actuellement à une diminution des traitements. Par contre, ceux qui présentent une perte d'hétérozygotie (LOH) du chromosome 1p ou 11q sont exclus de cette désescalade thérapeutique car ces facteurs génétiques semblent être indépendamment associés à un mauvais pronostic.⁵² Classiquement, les patients reçoivent des cycles de cyclophosphamide, de doxorubicine, de carboplatin et d'étoposide toutes les 3 semaines. La durée du traitement dépend du groupe de stratification basé sur des facteurs de risques cliniques et biologiques. En effet, les patients avec des tumeurs présentant des LOH vont recevoir le double du nombre de cycles de chimiothérapie. Dans un deuxième temps, la chirurgie tend à réaliser la résection la plus complète possible de la tumeur en préservant les organes adjacents et les fonctions neurologiques, entraînant parfois la présence de résidus tumoraux en post-chirurgie. Si ces résidus sont volumineux et/ou s'il existe une récurrence tumorale, une deuxième ligne de chimiothérapie est proposée au patient. Toutefois, si la chimiothérapie est inefficace ou si le patient est symptomatique, une radiothérapie est alors réalisée.²

Le traitement du NB à haut risque

Le traitement actuel des patients âgés de plus de 1 an et présentant un NB métastatique est une thérapie assez lourde qui s'étale sur environ 13 mois. Celle-ci consiste initialement à une induction par 6 cures de polychimiothérapie alternant toutes les 3 semaines sur une durée de 4 à 5 mois. Les cures 1 et 2 sont composées de cyclophosphamide et topotécan pour une durée de 5 jours. Les cures 3 et 5 représentent une association d'étoposide et de cisplatine (Cis) durant 3 ou 4 jours. Les cures 4 et 6 sont composées d'une dose plus élevée de cyclophosphamide pendant 6 heures de temps sur 2 jours, de la doxorubicine (Doxo) pendant 24 heures durant 3 jours et de la vincristine (Vin)

durant 3 jours. Ensuite, une exérèse de la tumeur primitive sera faite après la 5^{ème} cure de chimiothérapie. Il y aura par la suite une consolidation par chimiothérapie à haute dose composée de carboplatin, d'étoposide et de melphalan avec un support par autogreffe de cellules souches hématopoïétiques autologues. La collecte de cellules souches est réalisée chez le patient entre les cures de chimiothérapie. La radiothérapie sera également réalisée au site initial de la tumeur.

L'immunothérapie est devenue depuis quelques années une thérapie de choix comme phase finale du traitement de NB et plus particulièrement pour prévenir les rechutes.⁵⁴ Un anticorps monoclonal chimérique (ch14.18) dirigé contre le disialoganglioside (GD2) a été développé, reconnaissant spécifiquement les cellules de NB qui expriment à leur surface le GD2. La présence de cet anticorps à leur surface induit la mort des cellules tumorales par deux mécanismes : d'une part, une lyse directe induite par l'activation du complément, d'autre part, une cytotoxicité cellulaire via les cellules natural killer (NK) ou les granulocytes qui reconnaissent le fragment Fc du ch14.18. Par ailleurs, l'addition d'interleukine-2 (IL-2) et du facteur stimulant des colonies de granulocytes et macrophages (GM-CSF : *Granulocyte macrophage colony stimulating factor*) permet une meilleure activation des effecteurs cellulaires (cellules NK et granulocytes) et augmente l'efficacité thérapeutique du traitement. Ce protocole thérapeutique a permis d'augmenter le taux de survie sans rechute 2 ans après le traitement à l'immunothérapie jusqu'à 66%.⁶

1.6.2 Les nouveaux agents thérapeutiques

Récemment, des études ont permis d'identifier plusieurs cibles thérapeutiques potentielles du NB. Certaines d'entre-elles se montrent prometteuses dans les modèles précliniques.⁴

Inhibition d'ALK

Une mutation dans le domaine tyrosine kinase de l'oncogène *ALK* (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) a été identifiée comme étant une mutation associée à de très rares cas de NB héréditaires.⁵⁵ Cependant, elle est également retrouvée dans 15% des NB sporadiques à haut risque.¹ Une activation constitutive du récepteur de la tyrosine kinase

d'ALK semble contribuer au phénotype malin de nombreux cancers incluant le NB. ALK constitue donc une cible thérapeutique potentielle. Une molécule inhibitrice d'ALK, PF-02341066 ou Crizotinib, est actuellement testée par le COG (*Children's Oncology Group*) dans le cadre d'essais cliniques sur des patients pédiatriques atteints de tumeurs solides en rechute. ² Le Crizotinib inhibe significativement la croissance des cellules tumorales du NB. Une immunothérapie contre ALK est aussi en cours de développement. ⁵⁴

Inhibition d'Aurora A

Aurora A est une serine/thréonine kinase exprimée dans toutes les cellules et qui est importante dans la progression du cycle cellulaire. ⁵⁶ Elle est surexprimée dans plusieurs types de cancers incluant le NB où elle agit comme un oncogène. ⁵⁷ En raison de son rôle important dans les différentes étapes de la mitose, particulièrement dans la formation du fuseau mitotique, l'inhibition d'Aurora A peut représenter une approche thérapeutique efficace. En effet, MLN8237, un inhibiteur d'Aurora A, a démontré son efficacité dans les études précliniques et sera introduit dans une étude de phase I et II par le COG. ^{1,58}

L'inhibition de TRK

Les neurotrophines et leurs récepteurs tyrosine kinase sont importants dans le développement du système nerveux sympathique et sont impliquées dans la pathogenèse du NB. TRK A, TRK B et TRK C ont été identifiées comme récepteurs de facteurs de croissance neuronaux (NGF: *Nerve Growth Factor*), facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau (BDNF: *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) et la neurotrophine-3 (NT-3) respectivement. ⁵⁹ Une surexpression de TRK A est associée à un pronostic favorable ⁶⁰ et est inversement corrélée à l'amplification du gène *MYCN*. ⁶¹ La voie TRKB/BDNF semble favoriser la survie tumorale particulièrement dans les tumeurs ayant une amplification de *MYCN*. ⁶² *TRK B* est exprimé dans environ 40% des NB à haut risque. *TRK C* est exprimé dans 25% des NB et est fortement associé à l'expression de *TRK A*. ⁶³ Bien qu'on ne connaisse pas encore la véritable fonction des récepteurs TRK dans la pathogenèse du NB, ils sont des cibles thérapeutiques intéressantes. Plusieurs études en cours testent des agonistes de TRK A afin d'essayer d'induire une différenciation cellulaire alors que le

blocage de la signalisation BDNF/TRK B avec des inhibiteurs spécifiques comme CEP-751 semble induire de l'apoptose.^{62,64-66}

1.6.3 Récurrence et chimiorésistance

Durant les années soixante-dix, la probabilité de survie des patients atteints de NB à haut-risque n'excédait pas 15%. L'arrivée de nouvelles molécules telles que la vincristine et la cyclophosphamide a augmenté l'efficacité des traitements, mais cette efficacité est encore transitoire et les rechutes sont nombreuses pour les patients atteints de NB à haut risque. De plus, ces traitements sont associés à une toxicité importante en raison des fortes doses qui sont administrées.⁵⁴ Actuellement, 50 à 60% de ces patients font une rechute⁶⁷ et dans la majorité des cas, la tumeur qui récidive est réfractaire aux traitements.¹ En résumé, malgré les avancées observées dans le traitement par chimiothérapie, il existe **des phénomènes de chimiorésistance très importants dans le NB** qui nécessitent le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

Il est essentiel de mieux comprendre la biologie des cellules tumorales de NB, et en particulier, de comprendre quels sont les mécanismes cellulaires qui sont à la base de la chimiorésistance pour établir de nouvelles stratégies thérapeutiques. Il a été récemment démontré que l'un des processus cellulaires qui permet aux cellules tumorales de survivre aux traitements de chimiothérapie est l'autophagie.

Chapitre 2 : Autophagie

2.1 L'autophagie

Les cellules eucaryotes utilisent principalement deux systèmes évolutifs hautement conservés pour éliminer les organites et molécules endommagés ou devenus nocifs: le protéasome et l'autophagie.⁶⁸ L'autophagie, également appelée macro-autophagie, est un processus par lequel la cellule séquestre son propre contenu cytoplasmique tel que les protéines, lipides ou organites et les délivrent aux lysosomes où ils seront dégradés.⁶⁹ Les produits de dégradation comme les acides aminés, les carbohydrates et les lipides sont libérés dans le cytosol et vont être recyclés pour la synthèse de nouvelles protéines et organites ou bien décomposées pour fournir de l'énergie.⁷⁰ L'autophagie a été décrite morphologiquement en 1957 par des études en microscopie électronique de différenciation cellulaire de reins de souris.⁷¹ L'autophagie joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie, dans la protection contre le stress métabolique ainsi que dans la sénescence. Son altération est à la base de plusieurs désordres tels que les maladies neuro-dégénératives, métaboliques, infectieuses ainsi que le cancer.⁷²

2.2 Les différents types d'autophagie

Selon le mode de transmission du cargo (vésicules contenant agrégats de protéines et organites) aux lysosomes, l'autophagie est divisée en trois groupes: macro-autophagie (autophagie), micro-autophagie et autophagie médiée par les protéines chaperonnes (AMC) (Figure 5). La micro-autophagie implique une séquestration directe du cytoplasme par le lysosome alors que pour l'AMC, la protéine chaperonne HSC70, permet la translocation des protéines endommagées vers les lysosomes.⁷⁰

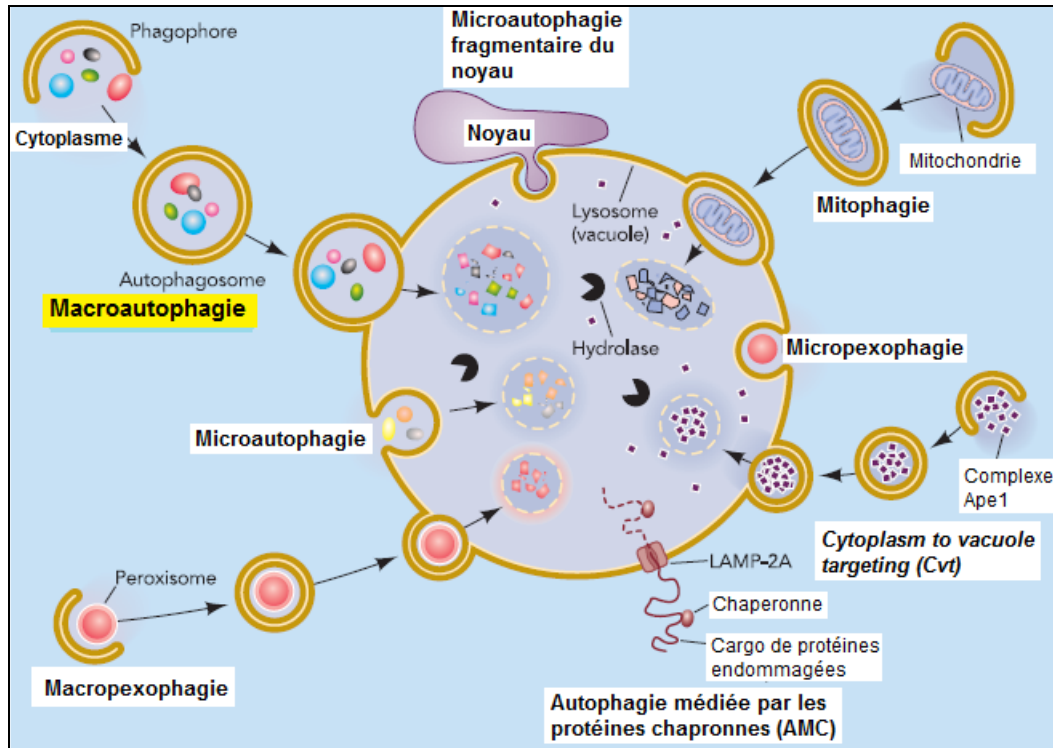


Figure 5 : Autophagie sélective et non sélective.

En fonction de la spécificité des cargaisons, l'autophagie peut être sélective ou non sélective. Au cours de l'autophagie non sélective, une partie du cytoplasme est séquestrée dans un autophagosome à double membrane, qui fusionne avec le lysosome/vacuole. En revanche, la dégradation spécifique des peroxysomes dans certaines conditions peut être réalisée soit par un mode macro- ou micro-autophagie, appelée macro-pexophagie et micro-pexophagie, respectivement. L'autophagie fragmentaire du noyau permet la dégradation d'une partie du noyau. La dégradation spécifique des mitochondries, appelée mitophagie a également lieu. Notez que ce schéma illustre les aspects de l'autophagie dans la levure et les cellules eucaryotes. *Illustration adaptée de Wei-Lien Yen and Daniel J. Klionsky, 2008*

2.3 Mécanisme

L'autophagie se produit à la suite de diverses situations de stress comme les carences nutritionnelles et l'hypoxie. Une fois activée, la machinerie autophagique peut être résumée en 4 étapes principales : formation du phagophore, élongation en double membrane (séquestration du matériel cytoplasmique), formation de l'autophagosome et

fusion avec les lysosomes. La formation des autophagosomes est une étape clé dans le processus autophagique. En effet, ce sont des organites assez particuliers de par leur structure ainsi que la régulation de leur dynamique.⁷³ Elles sont par ailleurs rapidement consommées par les lysosomes, leur demi-vie est de 10 à 25 minutes.⁷⁴ L'initiation de l'autophagie consiste en la formation du phagophore. Son origine reste mal connue, certains stipulent qu'il s'agit du réticulum endoplasmique (RE) puisqu'il est souvent observé à proximité des autophagosomes⁷³, alors que d'autres suggèrent que le RE, le golgi, la mitochondrie ainsi que le cytoplasme sont tous impliqués dans la formation du phagophore.⁷⁴⁻⁷⁶ Ce processus requiert principalement la phosphatidyl inositol 3-phosphate kinase (PI3K) de classe III associée à la protéine Beclin 1.⁷⁷ Ce complexe va produire de la phosphatidylinositol 3-phosphate entraînant le recrutement du premier système de conjugaison (ATG12-ATG5-ATG16).⁷⁸ Ce dernier permet, à son tour, la conjugaison de la phosphatidyl éthanolamine (PE) à l'extrémité C-terminale de la protéine LC3 qui va s'associer à la membrane autophagosomale. De plus, ATG7, ATG10 et ATG3 ainsi que ATG4 et ATG7 sont impliquées respectivement dans la régulation de la formation des complexes ATG12-ATG5-ATG16 et LC3-PE. À l'exception de la protéine LC3, toutes les autres protéines ATG impliquées dans la formation de l'autophagosome vont se dissocier rapidement de la membrane de l'autophagosome.⁷⁰ Cette caractéristique particulière de la protéine LC3-PE en fait un marqueur spécifique des autophagosomes. Enfin, les autophagosomes vont fusionner avec les lysosomes pour former une seule structure appelée alors autophagolysosome à l'intérieur duquel le matériel ciblé par la séquestration sera dégradé par les protéases lysosomales (Figure 6).⁷⁰

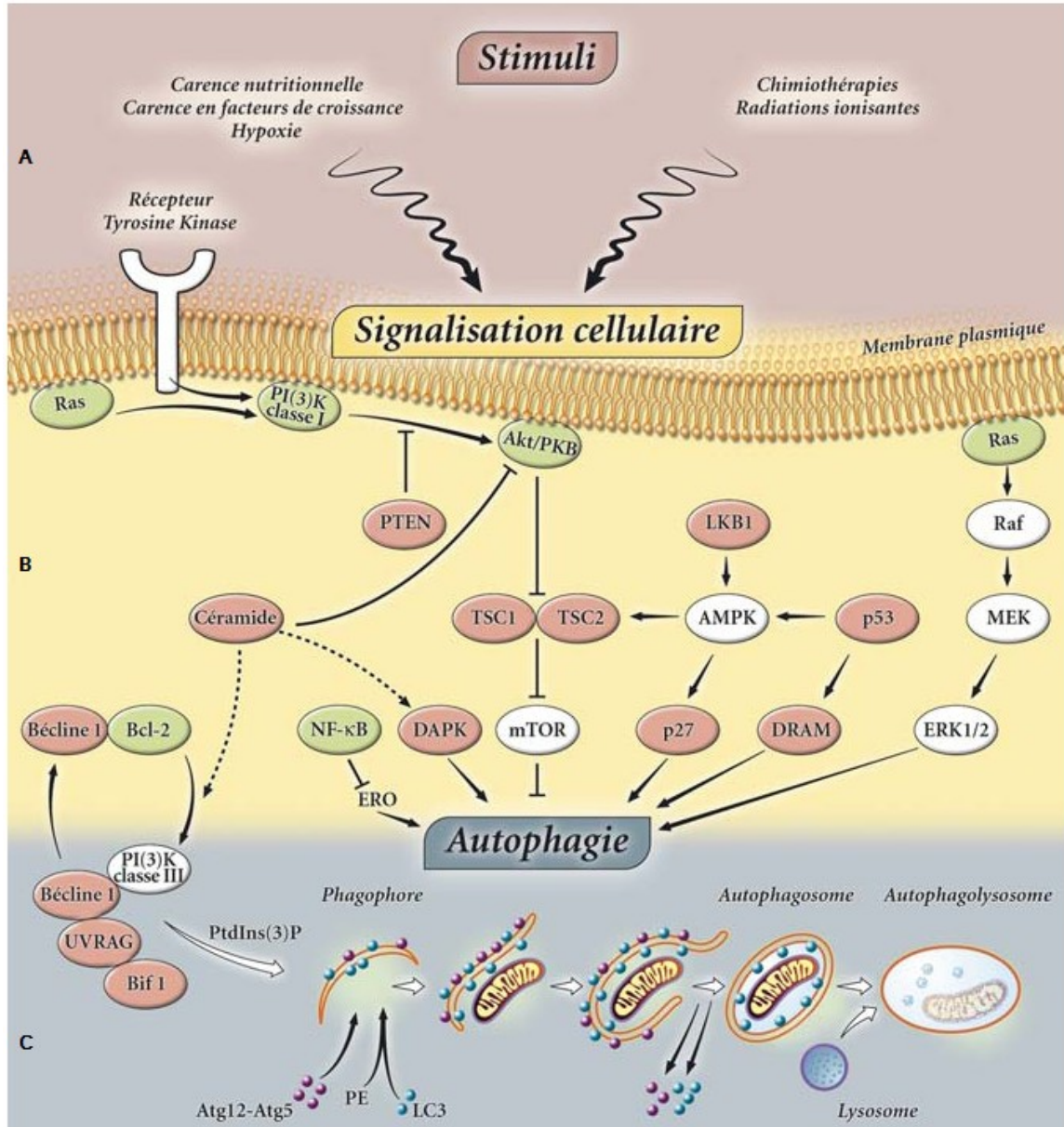


Figure 6: Mécanisme de l'autophagie et ses voies de régulation.

(A) L'autophagie peut être induite par différentes conditions de stress ou par des traitements anticancéreux. (B) Plusieurs oncosuppresseurs (représentés par des ovales roses) la régulent positivement, alors que certaines oncoprotéines (représentées par des ovales verts) ont un effet inhibiteur sur ce processus. mTOR joue un rôle central dans la régulation de l'autophagie dont l'activation conduit à l'inhibition de l'autophagie. L'activité de la protéine mTOR est régulée positivement par les oncoprotéines Ras et AKT/PKB, et négativement par des suppresseurs de tumeur comme TSC1/TSC2, PTEN, p53 et le céramide. (C) Étapes de l'autophagie. *Illustration adaptée de Lorin S et al. 2008*

2.4 La régulation de l'autophagie

2.4.1 Les voies de régulation de l'autophagie

L'autophagie est un processus induit par diverses situations de stress. Par conséquent, de nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans l'activation ou l'inhibition de l'autophagie (Figure 6). Le régulateur le mieux connu de l'autophagie est mTOR (*mammalian target of rapamycin*), une serine/thréonine kinase très conservée chez les eucaryotes.⁷⁹ Un sous complexe de mTOR appelé, mTORC1, joue un rôle central dans la vérification du niveau de nutriments disponibles, de signaux mitogéniques ainsi que le statut énergétique de la cellule. L'activité de mTORC1 est inversement corrélée avec l'induction de l'autophagie. En effet, la rapamycine, un inhibiteur de mTORC1, est un inducteur puissant d'autophagie même en présence de nutriments.⁷⁹ mTORC1 est régulé par le complexe de sclérose tubéreuse (TSC: *Tuberous Sclerosis Complex*) et RHEB (*Ras Homolog Enriched in Brain*), une petite GTPase qui active mTORC1 sous sa forme liée au GDP.⁸⁰ TSC possède une fonction GAP (*GTPase activating protein*) qui va hydrolyser GTP et par conséquent réguler négativement RHEB, inhiber l'activation de mTORC1 et activer ainsi l'autophagie.⁸¹

Quatre voies principales sont impliquées dans la régulation de l'autophagie (Figure 6):

La voie PI3K/AKT/mTOR

PI3K de classe I est principalement responsable du contrôle de la croissance cellulaire. La liaison des facteurs de croissance sur leurs récepteurs de type tyrosine kinase conduit à l'activation de la PI3K de classe I qui phosphoryle PI(4,5)P₂ en PI(3,4,5)P₃. Ceci va induire l'activation d'AKT et l'inhibition de TSC. Par conséquent, mTORC1 sera activé et l'autophagie inhibée.^{70,82,83}

La voie LKB1/AMPK

En réponse à un niveau réduit d'énergie, l'autophagie joue un rôle important dans la survie cellulaire. En effet, la voie LKB1/AMPK est responsable du contrôle du niveau d'énergie particulièrement le niveau d'ATP en régulant l'autophagie dépendamment ou non

de TSC. ^{84,85} Une insuffisance du niveau d'ATP résulte en une augmentation du ratio AMP/ATP, ce qui va activer LKB1, qui à son tour phosphoryle puis active AMPK. Une fois activée, AMPK va directement inhiber mTORC1 à travers TSC et activer par conséquent l'autophagie. ^{86,87}

Indépendamment de TSC, l'axe LKB1-AMPK peut phosphoryler et stabiliser p27, une kinase inhibitrice de cycline qui induit l'arrêt du cycle cellulaire, en induisant l'autophagie. ⁸⁵

De plus, les dommages à l'ADN peuvent également activer l'autophagie via p53 et la voie AMPK et TSC qui va inhiber mTORC1. L'activation de p53 induit également une augmentation du niveau de transcription de PTEN et TSC ou encore de la protéine DRAM (*Damage-regulated autophagy modulator*). ⁸⁸

La voie Ras/Raf/MEK/ERK

RAS, une petite GTPase, joue un double rôle dans la régulation de l'autophagie. En effet, RAS inhibe l'autophagie par activation de la voie PI3K de classe I. Cependant, elle peut également induire de l'autophagie via la voie RAF/MEK/ERK. ⁸⁹

Beclin 1 et la famille des Bcl-2

Beclin 1, ou ATG6, a été d'abord identifié comme étant une protéine qui interagit avec BCL-2. ⁹⁰ Par la suite, des études ont indiqué que Beclin 1 forme des complexes multimoléculaires avec de nombreuses autres protéines impliquées dans l'induction ou l'inhibition de l'autophagie. Néanmoins, la fonction principale de Beclin 1 se traduit par son interaction avec la PI3K de classe III. ⁹¹ En cas de présence adéquate d'acides aminés, PI3K de classe III peut catalyser Ptd3Ins en Ptd3Ins3P qui va activer AKT puis mTORC1 pour enfin inhiber l'autophagie indépendamment de la voie TSC1/2. ^{84,92,93}

BCL-2, une protéine possédant des propriétés anti-apoptotiques, possède également une fonction inhibitrice de l'autophagie. ⁹⁰ D'autres protéines anti-apoptotiques comme BCL-XL et MCL-1 sont aussi capables d'interagir avec Beclin 1 et d'inhiber l'autophagie.

Beclin 1 interagit avec la protéine BCL-2 via son domaine BH3. L'expression d'une protéine BH3 unique telle que la protéine pro-apoptotique BAD ou encore la

phosphorylation de BCL-2 durant une carence en nutriments va induire une dissociation du complexe Beclin 1/BCL-2 conduisant à l'activation de l'autophagie. ^{94,95} D'un autre côté, DAPK1 induit la phosphorylation du domaine BH3 de Beclin 1 induisant la dissociation du complexe Beclin 1/BCL-XL et active par conséquent l'autophagie. ⁹⁶

2.4.2 Les protéines ATG

Une trentaine de gènes hautement conservés appelés ATG ou régulateurs d'autophagie gouvernent l'autophagie. ⁸⁵ Ils ont d'abord été caractérisés chez la levure, à cause des facilités qu'offre l'analyse génétique chez cet organisme et de la grande taille de ses lysosomes (appelés vacuoles). Ces gènes codent pour des protéines qui contrôlent l'initiation, la séquestration du cargo et le trafic vers le compartiment lysosomal (Tableau V). ⁶⁹

Tableau V : Les protéines ATG et leurs fonctions

Levure	Humain	Fonction
Atg1	ULK1, 2	Kinase
Atg2	Atg2A, B	Complexe Atg9/Atg2-Atg18
Atg3	Atg3	"E2-like enzyme"
Atg4	Atg4A, B, C, D	Hydrolases
Atg5	Atg5	"E3-like activity"
Atg6	Beclin-1	Régulateur
Atg7	Atg7	"E1-like enzyme"
Atg8	MAP1LC3A, B, C, GABARAP, LI, L2	"Ubiquitin-like modifiers & regulators"
Atg9	Atg9A, B	Complexe Atg9/Atg2-Atg18
Atg10	Atg10	"E2-like enzyme"
Atg12	Atg12	Modificateur
Atg13	Atg13	Régulateur
Atg14	Atg14	Régulateur
Atg16	Atg16L1, 2	"E3-like activity"
Atg17	RB1CC1	Régulateur
Atg18	WIPI-1	Complexe Atg9/Atg2-Atg18

Ce tableau illustre certains gènes ATG impliqués dans différents stades de l'autophagie chez la levure et leurs homologues chez l'humain. Tableau adapté de C. Behrends et al, 2010

2.5 Les rôles de l'autophagie

2.5.1 Autophagie cytoprotectrice

L'autophagie est impliquée dans le maintien de l'homéostasie. Ainsi, elle se produit constamment et de manière constitutive, à un niveau basal, dans de nombreux tissus. La dégradation et le recyclage des protéines oxydées, structurellement endommagées ou résultant de mutations représentent probablement le rôle principal de l'autophagie. Plus intéressant, des études *in vitro* sur des cultures de tissus, montrent une instabilité génomique dans des cellules déficientes en autophagie subissant un stress métabolique conférant ainsi à l'autophagie un rôle de cyto-protection.⁶⁸ Par exemple, l'élimination de protéines et de mitochondries endommagées permet de prévenir l'accumulation d'agrégats de protéines ainsi qu'une production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui peuvent être toxiques pour la cellule.⁹⁷ L'induction de l'autophagie chez les organismes unicellulaires facilite la survie des cellules subissant une modification de l'environnement cellulaire, comme une carence en nutriments.⁹⁸ Une carence en azote chez la levure dont l'autophagie est déficiente, épuise les réserves internes d'acides aminés, empêche la synthèse des protéines et accélère la mort cellulaire.⁹⁹ Cependant, parallèlement à l'élimination des nutriments, des facteurs de croissance peuvent également induire l'autophagie. En plus de répondre à la pression métabolique, d'autres contraintes cytotoxiques telles que les dommages de l'ADN, le stress oxydatif et une hypoxie peuvent également induire l'autophagie dans les cellules tumorales afin de s'adapter au microenvironnement.¹⁰⁰ L'autophagie est également impliquée dans le développement normal¹⁰¹, la sénescence¹⁰², l'immunité et la défense contre l'invasion microbienne.¹⁰³ Plusieurs pathologies comme le cancer, les myopathies, les maladies neuro-dégénératives ainsi que des désordres gastro-intestinaux peuvent être le résultat d'une autophagie défectueuse.^{104,105}

2.5.2 Autophagie et mort cellulaire

Outre son grand rôle dans le maintien de la survie cellulaire, une autophagie excessive peut conduire à une mort cellulaire autophagique, appelée aussi mort cellulaire programmée de type II qui est distincte de l'apoptose (mort cellulaire programmée de type

I) et de la nécrose.^{106,107} Celle-ci fut décrite initialement dans les cellules du carcinome mammaire.^{108,109} Il a été démontré que les protéines impliquées dans l'autophagie sont nécessaires à la mort cellulaire dans certaines conditions, comme pour les cellules ayant une apoptose défailante.¹¹⁰ Alors que dans de telles situations, l'autophagie s'avère essentielle pour le mécanisme de mort cellulaire, dans d'autres, l'autophagie va plutôt protéger la cellule contre l'apoptose en fournissant des nutriments.¹¹¹ La régulation de l'autophagie et de l'apoptose sont étroitement liées via le complexe Beclin 1/BCL-2. BCL-2 va inhiber l'autophagie en se liant à Beclin 1 empêchant ainsi son association avec PI3K de classe III.⁹⁰

En plus de son implication dans l'activation de l'autophagie, ATG5 joue aussi un rôle dans la voie apoptotique. Des études ont rapporté qu'ATG5 s'associe avec la protéine FAAD (*Fas-associated death domain*) en induisant la mort cellulaire médiée par l'IFN γ .¹¹² Aussi, la surexpression d'ATG5 augmente la tendance de la cellule à entrer dans une phase apoptotique à la suite de différents stimuli incluant des agents anticancéreux.¹¹³ Ces stimuli vont permettre l'activation de la calpaïne, une enzyme protéolytique, conduisant au clivage d'ATG5. Une fois cette dernière tronquée, elle va provoquer la libération du cytochrome C et ainsi l'induction de l'apoptose.¹¹²

2.6 Autophagie et cancers

Dans le cancer, le rôle de l'autophagie est complexe et parfois contradictoire. D'une part, elle a une action anti-tumorale : une suppression ou une forte diminution de l'expression de Beclin 1 et d'ATG 5 favorise la tumorigenèse.¹¹⁴⁻¹¹⁶ D'autre part, d'autres études stipulent que l'autophagie pourrait exercer une fonction pro-tumorale en raison de son rôle crucial dans le maintien de la stabilité de l'environnement intracellulaire. D'autres études montrent que l'autophagie serait un mécanisme essentiel dans la chimiorésistance des cellules tumorales.¹¹⁷

En résumé, l'autophagie a une fonction complexe et controversée dans la biologie du cancer.

2.6.1 Autophagie : mécanisme de suppression tumorale (effet anti-tumoral)

2.6.1.1 L'absence d'expression d'ATG favorise la survenue des cancers

Lorsqu'il y a diminution des gènes ATG dans les cellules normales, le taux d'incidence de tumeurs augmente. Par exemple, les souris hétérozygotes $ATG6^{+/-}$ présentent une incidence plus élevée de tumeurs et sont plus sujettes à développer un cancer induit par le virus de l'hépatite B par rapport aux souris contrôles.^{114,116} Les souris dépourvues d'une copie de Beclin 1 ont une tendance accrue à développer des tumeurs spontanées comme le carcinome hépatocellulaire, le lymphome à cellules B et les adénocarcinomes du poumon. Les souris knock-out pour ATG4 montrent également une susceptibilité accrue aux fibrosarcomes.¹¹⁸

Par conséquent, il est évident que la suppression des gènes ATG contribue à la tumorigenèse, ce qui attribue donc un rôle anti-tumoral de l'autophagie.

2.6.1.2 Diminution ou absence de l'expression des ATG dans les cancers

Dans les tumeurs de stade avancé, on décrit souvent une diminution de l'expression des ATG et donc de l'autophagie. Ainsi, il a été rapporté que les niveaux d'expression des gènes impliqués dans l'autophagie comme les ATG sont réduits à la suite d'une délétion monoallélique ou d'une mutation, voir totalement perdus dans certains types de cancer.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Par exemple, il existe une délétion monoallélique du gène *Beclin 1* dans certaines formes de cancer du sein, de l'ovaire et de la prostate.¹¹⁹ Un grand nombre de cancers du système nerveux central sont également caractérisés par des niveaux réduits de Beclin 1.¹²⁰ Des mutations des gènes ATG2B, ATG5, ATG9B et ATG12 sont présentes dans les cancers gastriques et colorectaux avec une instabilité des microsatellites.¹²¹

2.6.1.3 Diminution de l'expression des protéines pro-autophagique dans les cancers

La diminution de l'expression de la protéine de liaison pro-autophagique (Bax: *Bax binding protein-1*) a été identifiée dans l'adénocarcinome du côlon.¹²²

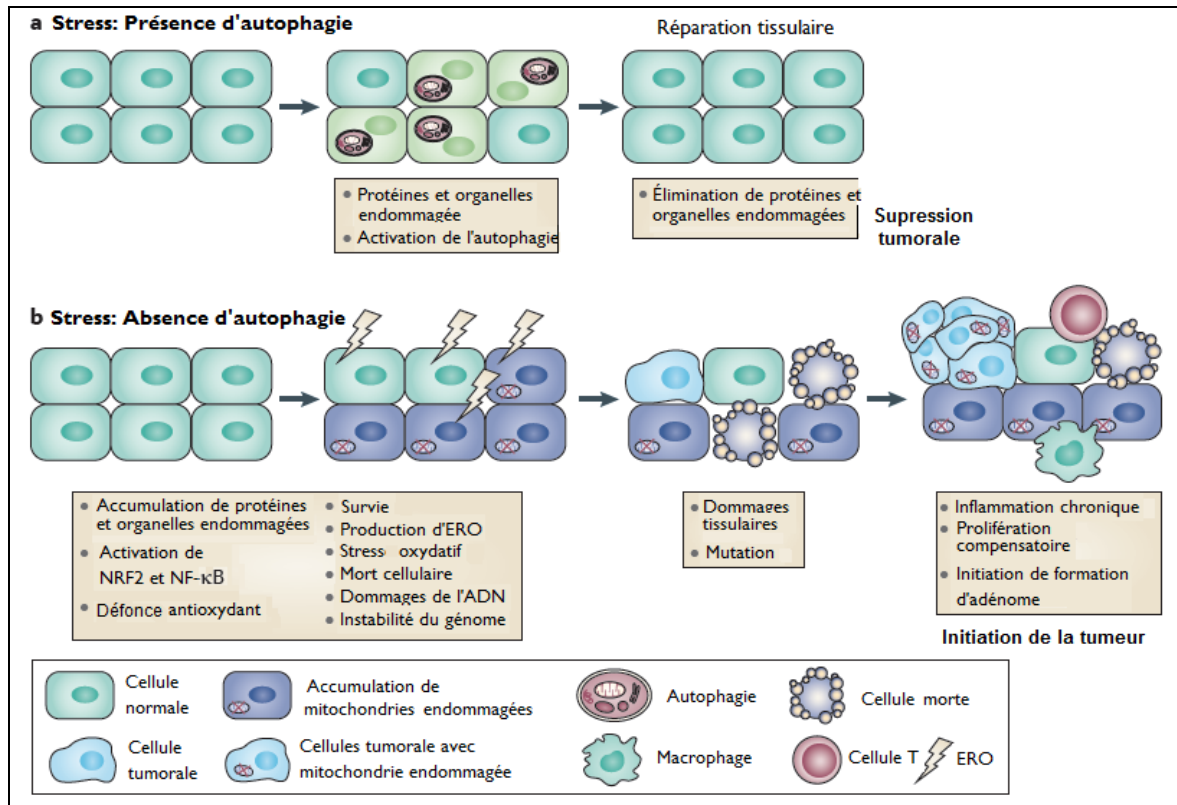


Figure 7 : Rôle de l'autophagie dans la suppression tumorale.

(A) L'autophagie prévient l'accumulation des protéines et organites endommagés. **(B)** En absence d'autophagie, l'accumulation de protéines et organites endommagés, production d'ERO, dommages à l'ADN et l'instabilité génomique associés à l'activation de voies de signalisation oncogéniques conduisent à l'initiation de la tumeur. *Illustration adaptée de E. White, 2012*

2.6.2 Autophagie : mécanisme de survie tumorale (effet pro-tumoral)

Il a été démontré qu'il y avait une augmentation de l'activité autophagique dans des cancers du pancréas afin de permettre le maintien de la croissance tumorale, alors que son inhibition entraîne une diminution de la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*.¹²³ Durant les situations de stress (manque de nutriments et/ou de facteurs de croissance et/ou

d'oxygène), l'autophagie peut agir comme un important fournisseur d'intermédiaires métaboliques pour les cellules cancéreuses.¹²⁴ L'autophagie est aussi importante dans les phénomènes métastatiques où les cellules font face à différentes situations de stress comme l'absence d'interaction avec la matrice extracellulaire pouvant même entraîner la mort cellulaire (anoikose).¹²⁴

Récemment, un nouveau phénomène observé durant la tumorigenèse consiste à recruter les cellules avoisinantes de la tumeur et à les forcer à activer l'autophagie afin d'alimenter leur propre prolifération.¹²⁵ En effet, les cellules tumorales vont déclencher un stress oxydatif dans le voisinage cellulaire incluant les fibroblastes et d'autres cellules stromales ce qui va induire une production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dont les radicaux libres. Ceci va faire en sorte que ces cellules vont activer l'autophagie et surproduire des nutriments ainsi que des métabolites riches en énergie qui vont être utilisés par les cellules tumorales.

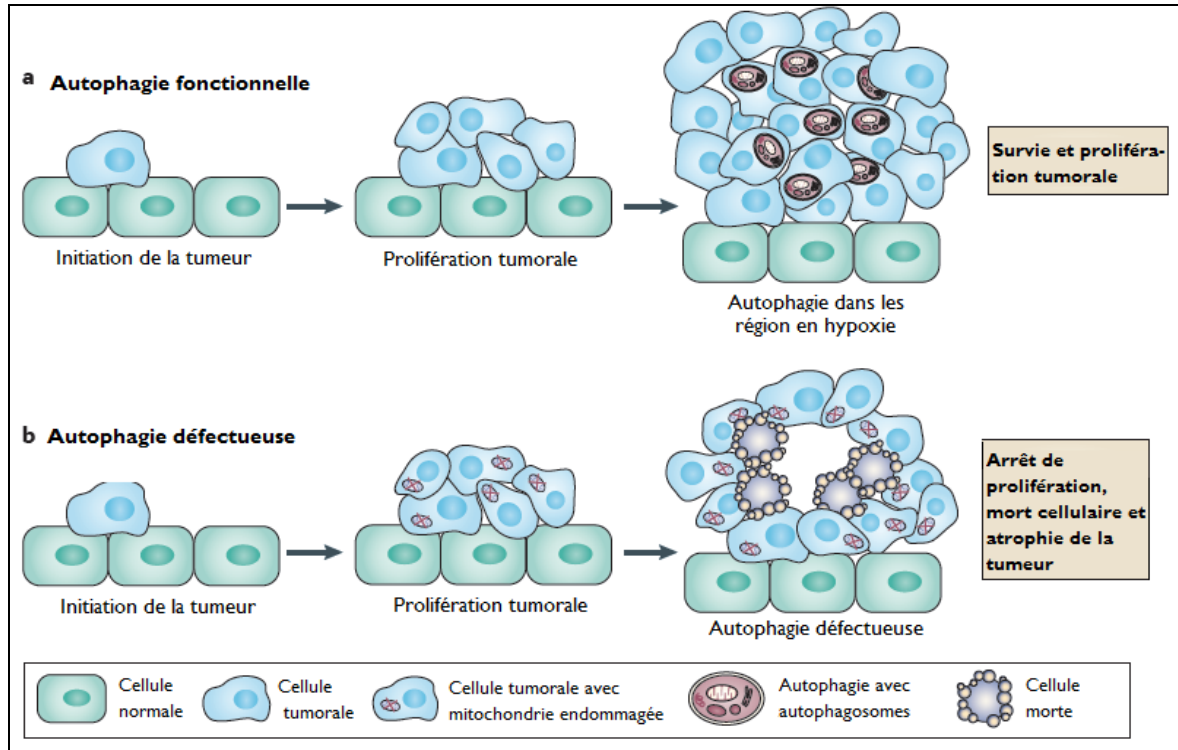


Figure 8 : Rôle de l'autophagie dans la survie et l'agressivité de la tumeur.

(A) L'autophagie est activée dans les régions tumorales en hypoxie. (B) Une autophagie défectueuse dans les cellules tumorales induit une accumulation des mitochondries endommagées qui résulte en une mort cellulaire dans les régions en hypoxie. *Illustration adaptée de E. White , 2012*

2.7 Autophagie et chimiothérapie

Le rôle de l'autophagie dans la suppression ou la survie des cellules tumorales est également à prendre en considération dans le contexte des thérapies anticancéreuses. En effet, de nombreuses études notent une augmentation de l'autophagie en réponse à la chimiothérapie (rapamycine et de ses analogues, témozolomide, tamoxifène, trioxyde d'arsenic, inhibiteurs d'histones déacétylases) et aux radiations ionisantes.^{126,127} Dans le passé, une accumulation d'autophagosomes dans les cellules cancéreuses à la suite d'un traitement anticancéreux a été observé, laissant supposer une mort autophagique, ce qui n'est pas forcément le cas. En effet, il a été montré que selon le contexte cellulaire et le traitement utilisé, l'autophagie induite par ces traitements peut induire la mort des cellules tumorales ou, au contraire, avoir un rôle cytoprotecteur.^{126,127}

Le rôle cytoprotecteur de l'autophagie permet aux cellules de recycler leurs protéines et organites endommagés par les différents traitements; cet apport de nutriments supplémentaire favorise leur prolifération^{128,129} et leur survie et ainsi compromet l'efficacité de la chimiothérapie.

Par conséquent, le concept de l'inhibition de l'autophagie potentialisant l'effet des agents chimiothérapeutiques est né et a donné lieu à plusieurs études et essais cliniques.^{130,131} De nombreuses études appuieraient cette notion dans de multiples types de tumeurs soulignant la possibilité de cibler l'autophagie comme thérapie adjuvante contre le cancer. L'effet de l'inhibition de l'autophagie en combinaison avec des thérapies anticancéreuses actuelles a été testé dans de multiples modèles tumoraux incluant le gliome¹³²⁻¹³⁴, le myélome multiple¹³⁵, le cancer du sein^{128,136}, le cancer du côlon^{137,138} et le cancer de la prostate (Tableau VI).¹³⁹

En conclusion, la suppression chronique de l'autophagie peut stimuler l'oncogenèse, cependant, une fois que la tumeur est formée, l'inhibition de l'autophagie peut être un objectif thérapeutique pour la chimiosensibilisation.⁷⁰

Tableau VI : Inhibition d'autophagie et chimiothérapie

Type de cancer	Traitement primaire	Cible	Méthode(s) d'inhibition d'autophagie
Mammaire	Trastuzumab	Her2	3-MA, BafA, RNAi (LC3)
	CPT	DNA topoisomérase	3-MA, BafA, RNAi (BECN1, ATG7)
LMC	Imatinibe	BCR/ABL	CQ, BafA, RNAi (ATG5, ATG7)
	INNO-406	BCR/ABL	CQ
	SAHA	HDAC	CQ, 3-MA
Colon	Vorinostat	HDAC	CQ, RNAi (ATG7)
	Radiation	Dommmages à l'ADN	RNAi (BECN1, ATG3, ATG4B, ATG5)
Gliome	AKTi-1/2	AKT	CQ
	PI-103	PI3K, mTOR	CQ
	Imatinibe	Tyrosine kinases	BafA
	Radiation	Dommmages à l'ADN	3-MA, BafA RNAi (BECN1 ATG5)
	Radiation	Dommmages à l'ADN	3-MA, BafA
Tumeur rhabdoïde maligne	FK228	HDAC	CQ
Myélome multiple	8-Aminoadenosine	Synthèse de l'ADN	CQ
Prostate	ADI-PEG20	Arginine dans le sang	CQ, 3-MA, RNAi (BECN1)

Abréviations: **BafA:** bafilomycine A1; **CPT:** camptothécine; **CQ:** chloroquine; **FK228:** *romidepsin (bicyclic histone deacetylase inhibitor)*; **HDAC:** histone déacétylase; **INNO-406:** *Bafetinib (a dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor)*; **LMC:** leucémie myéloïde chronique; **MNNG:** N-méthyl-N0-nitro-N-nitrosoguanidine; **mTOR:** cible de la rapamycine chez les mammifères; **PI3K:** phosphoinositide 3-kinase; **RNAi:** ARN interférant (la cible ATG entre parenthèses); **SAHA:** suberoyl anilide hydroxamic acid (inhibiteur HDAC).

Tableau adapté de N. Chen, J. Debnath et al. 2009.

2.8 Les inhibiteurs d'autophagie

Plusieurs inhibiteurs pharmacologiques agissant à différentes étapes de l'autophagie ont été développés. En effet, l'inhibition de l'autophagie peut être précoce en intervenant sur le processus d'initiation de l'autophagie ou peut être tardive en agissant sur les étapes finales en interférant la fusion des lysosomes avec les autophagosomes. Trois types d'inhibiteurs d'autophagie sont connus: (i) la 3-méthyladénine (3-MA) et la Wortmannin inhibent la formation d'autophagosomes par la restriction du recrutement de PI3K de classe III à la membrane; (ii) la Chloroquine (CQ) et l'Hydroxychloroquine (HCQ) affectent la dégradation du contenu cytoplasmique par augmentation du pH lysosomal; (iii) la Bafilomycine A1 (BafA) empêche la fusion des lysosomes avec les autophagosomes.¹⁴⁰

2.8.1 Hydroxychloroquine

CQ et HCQ sont les inhibiteurs d'autophagie les plus communément utilisés en clinique. Découverte en 1934, CQ fut administrée contre la malaria en 1947.¹⁴¹ Depuis, on utilise la CQ contre des maladies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux disséminé. HCQ, un analogue de CQ, a été initialement développé afin de remédier à la toxicité rétinienne qu'engendrait la CQ. Structurellement, HCQ représente l'addition d'un groupement hydroxyle à la forme CQ. Cette propriété permet de limiter sa capacité à traverser la barrière hémato/rétinienne et réduire ainsi sa toxicité. Cependant, l'effet toxique de l'HCQ n'est pas totalement éliminé puisque de nombreux cas de rétinoopathies ont été observés à la suite du traitement à l'HCQ.¹⁴²

Dans notre étude, l'HCQ sera utilisée comme agent inhibiteur d'autophagie. Outre ses propriétés de modulation du système immunitaire (diminution de la réponse inflammatoire, diminution de production de cytokines par les macrophages et les lymphocytes et la diminution de la signalisation des récepteurs de type Toll)¹⁴³, HCQ permet l'inhibition de l'acidification des lysosomes ce qui va neutraliser son effet de dégradation. Par conséquent, l'autophagie ne peut être finalisée en raison de l'inhibition des enzymes lysosomales ; cela induit une accumulation des autophagosomes dans le cytoplasme.¹⁴³

Chapitre 3 : Cellules Souches Cancéreuses (CSCs)

3.1 Concept des CSCs

La principale caractéristique qui définit les cellules souches (CS) est l'auto-renouvellement. Ceci leur permet de se perpétuer et de se différencier pour donner naissance à plusieurs types de cellules différenciées.^{144,145} Les CSs sont classées en CS embryonnaires et adultes. Alors que les CS embryonnaires sont capables de se différencier en cellules appartenant aux trois lignées germinales afin de développer tous les types de tissus du corps, les CS adultes peuvent uniquement se différencier en un seul type de cellule et permettre ainsi le maintien et la régénération du tissu. De nombreuses études stipulent l'existence d'une troisième catégorie de cellules, appelée cellules initiatrices de tumeurs (CIT) ou cellules souches cancéreuses (CSC : *cancer stem cell*), qui seraient à la base d'une multitude de tumeurs solides et hématologiques. En effet, ce modèle prédit que ces cellules sont à la base de tumorigénèse, des métastases, de la récurrence des cancers et de la résistance aux thérapies anticancéreuses. Les CSCs constituent une petite population de cellules qui se caractérisent par une capacité d'auto-renouvellement et une tumorigénicité capable de recréer *in vivo* l'hétérogénéité tumorale initiale dans les souris xénotransplantées. Les CSCs sont caractérisées par une agressivité tumorale élevée ainsi que par un état de quiescence. Ces deux propriétés suggèrent que la chimiothérapie conventionnelle, qui cible les cellules cancéreuses différenciées en prolifération, est peu efficace sur les CSCs, ce qui mène à la rechute et la récurrence de la tumeur comme on le retrouve dans les NB de haut grade. Il devient par conséquent impératif de mieux comprendre les caractéristiques biologiques qui distinguent les CSCs et de développer des traitements ciblés contre ces cellules.

3.1 Les modèles stochastique et hiérarchique des CSCs

Depuis plusieurs décennies, deux théories sur les CSCs ont suscité un grand intérêt au sein de la communauté scientifique et ont fait l'objet de diverses études. En effet, deux modèles ont été suggérés afin d'expliquer l'hétérogénéité des tumeurs : le modèle

stochastique et le modèle hiérarchique. Le modèle stochastique décrit un modèle anarchique où toutes les cellules d'une tumeur vont pouvoir former une autre tumeur similaire à la tumeur primaire d'où elle provient et être capables de donner des métastases et régénérer la tumeur après avoir résisté aux traitements anticancéreux.¹⁴⁶ A l'opposé, le modèle hiérarchique s'oriente plutôt vers un modèle plus organisé où seule une fraction de la tumeur est capable d'initier une autre tumeur.¹⁴⁵

En 1994, une sous-population de cellules provenant de leucémie myéloïde aiguë (LMA) ayant un phénotype de surface $CD34^+CD38^-$ et possédant des caractéristiques de cellules souches a été découverte. Une fois transplantée dans des souris immunosupprimées, ces cellules étaient capables, à elles seules, de régénérer la LMA.¹⁴⁷ Ceci était une preuve concluante pour soutenir le modèle hiérarchique des CSCs. Ce modèle a également permis de confirmer la tumorigénicité des CSCs dans diverses tumeurs solides incluant des tumeurs du sein, du colon, du poumon et du cerveau.¹⁴⁸ La capacité d'une population cellulaire à reformer la tumeur d'origine dans des souris immunosupprimées est devenue un critère indispensable pour identifier les CSCs.¹⁴⁹

3.2 Les marqueurs des CSCs

Une multitude de marqueurs de CSCs ont pu être identifiés : protéines membranaires, enzymes ou récepteurs. CD34, ALDH1, CD44, CD166, DCAMKL-1, LGR5 et CD133 sont des marqueurs qui permettent d'isoler cette sous population tumorale.¹⁵⁰⁻¹⁵² Dans le cadre de ce mémoire, nous avons utilisé CD133 comme marqueur de cellules souches cancéreuses dans le NB.

3.2.1 CD133

Également appelée Prominin-1, le CD133 est une glycoprotéine d'environ 115 à 120 kDa possédant cinq domaines transmembranaires dont la fonction reste jusqu'à ce jour non élucidée. Isolées en 1997 à partir de CSCs hématopoïétiques, plusieurs études ont démontré que des cellules enrichies en CD133 ($CD133^{\text{haut}}$), avaient des caractéristiques de CSCs.¹⁵³ L'utilisation d'un anticorps dirigé contre CD133 a permis d'isoler les CSCs dans plusieurs tumeurs cérébrales, telles que le glioblastome multiforme, le médulloblastome et l'épendyome. Par la suite, CD133 a également été utilisé comme marqueur de CSCs dans

les carcinomes colorectaux et pancréatiques ^{154,155} ainsi que dans de nombreux autres cancers (Tableau VII).

Des études réalisées dans notre laboratoire ont démontré que CD133 est un marqueur de CSCs dans le NB. ¹⁵⁶ En effet, les cellules exprimant le CD133 ont une capacité accrue à former des colonies cellulaires et des neurosphères. De plus, nous avons montré qu'une injection orthotopique de seulement 500 cellules CD133^{haut} était suffisante pour établir une tumeur et développer des métastases contrairement au groupe contrôle (CD133^{bas}).

Tableau VII : CD133 marqueur de CSCs dans plusieurs cancers

Tumeurs	Source	Caractérisation	Auteurs
Tumeur cérébrale	Tumeurs primaire	<i>In vitro</i>	Singh et al., 2003 et Singh et al., 2004
Cancer du pancréas	Tumeurs primaire	<i>In vitro</i> et <i>In vivo</i>	Olempska et al., 2007 et Hermann et al., 2007
Cancer du colon	Tumeurs primaire	<i>In vitro</i> et <i>In vivo</i>	O'Brien et al., 2007 et Ricci-Vitiani et al., 2007
Hépatocarcinome cellulaire	Lignée cellulaire	<i>In vitro</i> et <i>In vivo</i>	Yin et al., 2007 et Suetsugu et al., 2006
Cancer de la prostate	Tumeurs primaire	<i>In vitro</i>	Collins et al., 2005
Cancer du rein	Tumeurs primaire	<i>In vitro</i> et <i>In vivo</i>	Bruno et al., 2006
Cancer laryngique	Lignée cellulaire	<i>In vitro</i>	Zhou et al., 2007
Mélanome	Lignée cellulaire et tumeurs primaire	<i>In vitro</i> et <i>In vivo</i>	Monzani et al., 2007
Cancer du poumon	Tumeurs primaire	<i>In vitro</i> et <i>In vivo</i>	Eramo et al., 2008
Cancer de l'ovaire	Tumeurs primaire	<i>In vitro</i> et <i>In vivo</i>	Ferrandina et al., 2008
Neuroblastome	Tumeurs primaires et lignées cellulaire	<i>In vitro</i> et <i>In vivo</i>	Sartelet et al., 2012 et Cournoyer et al., 2012

Tableau adapté de Zang H. et L. SY., 2010

3.3. CSCs et chimiorésistance

Une des caractéristiques importantes des CSCs c'est leur chimiorésistance naturelle à l'égard des thérapies anticancéreuses. En effet, la quiescence des CSCs leur permet d'échapper aux thérapies visant les cellules qui se divisent rapidement. ¹⁵⁷ De plus, les CSCs possèdent des mécanismes de réparation d'ADN plus actifs ce qui inhibe leur entrée

en apoptose en réponse aux agents génotoxiques. Enfin, les CSCs surexpriment les transporteurs ABC qui rejettent les drogues hors de la cellule.^{158,159} Celles-ci peuvent alors développer des récidives secondaires chimiorésistantes.

Dans le même contexte, une étude a prouvé que les CSCs CD133^{haut} isolées de glioblastome ont une plus forte résistance aux chimiothérapies standards telles que le témozolomide, le carboplatine, le paclitaxel et l'étoposide. Il a même été démontré que l'expression de CD133 est plus élevée dans les glioblastomes récurrents, illustrant ainsi une plus grande résistance malgré des thérapies agressives.¹⁵³ De plus, il a été noté que la fraction cellulaire CD133^{haut} augmentent *in vitro* et dans les modèles de xénogreffes chez les souris, en réponse à une exposition croissante de traitement dans les gliomes.¹⁶⁰ Ce phénomène est également observé dans les cancers du sein où l'exposition à la radiation augmente la fraction cellulaire de CSCs exprimant CD44⁺/CD24⁻/faible/Lignage-.¹⁶¹

De plus, il a été démontré que les gènes anti-apoptotiques *BCL-2* et *BCL-xL* sont surexprimés dans les CSCs CD133^{haut} alors que l'expression des gènes pro-apoptotiques tel que *Bax* est diminuée dans le glioblastome.¹⁶² Aussi, une surexpression du gène *BCL-2* contribuerait à la résistance des CSCs CD133^{haut} du médulloblastome au traitement et à l'inducteur d'apoptose par TRAIL.¹⁶³

En conclusion, élucider les propriétés biologiques qui gouvernent le caractère souche et résistant des CSCs est d'une importance majeure dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées visant à éradiquer le cancer.

Chapitre 4 : Projet de recherche

Représentant 12% des cancers pédiatriques au Canada, le NB est la tumeur solide extra-crânienne la plus commune et la plus agressive.¹⁶⁴ Elle est caractérisée par une grande hétérogénéité ce qui lui confère un pronostic très variable. En effet, la tumeur peut régresser spontanément sans aucun traitement ou bien être très agressive traduisant un profil métastatique ayant de fortes probabilités de rechutes et de récurrence. En dépit d'une thérapie multimodale très agressive, seulement 60% à 66% des patients survivent à la maladie. De nombreuses études démontrent que l'une des raisons des échecs aux traitements du NB est la chimiorésistance.¹⁶⁵ Cette résistance est due à différents mécanismes biologiques, dont l'autophagie, qui contribuent à leur phénotype agressif.

En effet, plusieurs études récentes portant sur des tumeurs pédiatriques ont mis en évidence la contribution de l'autophagie dans la résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie.^{134,166}

4.1 Objectifs de recherche

Ce mémoire traite d'une problématique majeure impliquée dans le traitement du NB à haut risque: la chimiorésistance. Dans le cadre de ce projet, la chimiorésistance a été explorée à travers l'étude du phénomène d'autophagie et de son implication dans la résistance aux traitements du NB.

Les objectifs seront par conséquent les suivants:

- 1. Déterminer si l'autophagie est présente dans les NBs et si elle présente une valeur pronostique.**
- 2. Évaluer la modulation de l'autophagie dans le NB traité par chimiothérapie.**
- 3. Démontrer l'intérêt de l'inhibition de l'autophagie associée à la chimiothérapie *in vitro* et *in vivo* et ainsi mettre en évidence le rôle de l'autophagie dans la chimiorésistance du NB.**

4.2 Stratégie expérimentale

Afin de permettre la réalisation de ce projet de recherche, nous avons eu recours à diverses techniques expérimentales *in vitro* et *in vivo*. L'article suivant présente les stratégies utilisées ainsi que les résultats obtenus.

Chapitre 5: Matériel et méthodes

5.1 Lignées cellulaires de NB

Les lignées cellulaires SK-N-DZ, SK-N-SH et SK-N-FI, obtenues de l'*American Type Culture Collection* (ATCC), proviennent de métastases de moelle osseuse de NB. Les cellules N91-IGR et NB8-IGR proviennent de l'Institut Gustave Roussy (Villejuif, France) et dérivent elles aussi de métastases de moelle osseuse. Les cellules NB-10 dérivent de métastases hépatiques. Elles proviennent de l'Hôpital St. Jude (Memphis, TN, É.-U.).

La lignée SK-N-DZ contient une amplification *MYCN*, un gain chromosomique 17q ainsi qu'une LOH 1p et 11q. Les NB8-IGR et N91-IGR contiennent toutes deux l'amplification *MYCN*, la LOH 1p et le gain du chromosomique 17q. Les SK-N-FI contiennent le gain 17q et la LOH 11q. Les SK-N-SH contiennent le gain 17q et la LOH 1p. Les NB10 contiennent l'amplification *MYCN*, le gain 17q et la LOH 1p. Les cellules sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée composée de 95% d'air et 5% de CO₂ et sont mises en culture dans un milieu approprié contenant du DMEM supplémenté avec 1% pénicilline/streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal (SVF).

5.2 Cytométrie de flux

Les cellules marquées avec un anticorps CD133 et un isotype contrôle couplés au fluorochrome APC, ((CD133/2 (293C3)-APC human, Miltenyi Biotec et IgG2b-APC mouse, Miltenyi Biotec pour l'isotype contrôle) sont incubées à 4°C pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. Après centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu dans une solution de marquage (2% SVF + PBS 1X) puis filtré à l'aide de tubes à filtre (BD Biosciences, É.-U.). Les cellules sont ensuite triées par cytométrie de flux avec le FACSariaTM (Beckman Dikenson, San Jose, CA, É.U.). Les cellules CD133^{haut} ou CD133^{faible} sont récoltées dans les tubes de 15 mL (2mL 2% SVF + 1 mL PBS 1X par tube). Les limites de pureté pour considérer le tri acceptable ont été de 90%.

5.3 Extraction des protéines et immunobuvardage

Dans le but de déterminer les niveaux d'autophagie présents dans les CSCs du NB, les deux populations cellulaires CD133^{haut} et CD133^{bas} ont été obtenus après le tri par cytométrie de flux des lignées SK-N-DZ et NB8-IGR. Une lyse cellulaire a été effectuée suivie d'un immunobuvardage. Pour l'extraction de protéines, les populations cellulaires ont été centrifugées afin d'obtenir un culot. Les culots ont été resuspendus dans 500 µl de tampon de lyse (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.5% P-40 Nonidet, 1 mM orthovanadate de sodium, 1 mM fluorure de sodium) et incubés 30 minutes à 4 °C afin d'obtenir les lysats cellulaires. La quantité des protéines contenu dans les lysats cellulaires sont déterminées avec le réactif Micro BCATM (Thermo Scientific, Rockford, IL, É.-U) à 60°C. Après, avoir calculé une quantité égale de protéines (20 µg) dans tous les échantillons de lysats cellulaires, les protéines ont été solubilisées dans un tampon de Laemmli, portées à ébullition pendant 5 minutes, séparées par SDS-PAGE, transférées sur des membranes de polyvinylidene difluoride (PVDF). Les liaisons non spécifiques ont été bloquées par une incubation des membranes d'une heure à la température pièce avec un tampon TBS (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl) contenant 3% d'albumine sérique bovine (BSA). Les membranes ont été ensuite incubées avec les anticorps primaires (CD133 1/200 (AC133) pure, Miltenyi Biotec), LC3B 1/3000 (ab65041, abcam) et β-actine 1/5000 (ab82227, abcam) toute la nuit à 4 °C. Une étape de lavage de 15 minutes des membranes de PVDF dans un tampon TBS (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl) contenant 0.1% de Tween 20 a été effectuée 4 fois. Les membranes PVDF sont ensuite incubées une heure avec des anticorps anti-lapin ou anti-souris conjugués à la peroxydase horseradish dilués dans 3% de BSA et suivi d'une seconde étape de lavage de 15 minutes dans un tampon TBS (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl) contenant 0.1% de Tween 20. Des bandes immunoréactives sont visualisées à l'aide d'un système de détection à l'ECL (PerkinElmer, Waltham, MA, É.-U).

5.4 Études *in vivo*

Les études *in vivo* ont été acceptées par le comité d'éthique animal du CHU Sainte Justine (protocole 509). Les souris humanisées *NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice*

(NSG) ont été utilisées. Cinq millions ($5 \cdot 10^6$) de cellules N91-IGR ont été injectées en sous-cutanée. L'expérimentation a été réalisée à l'animalerie du CHU sainte-Justine. Un suivi clinique des souris (poids, signes vitaux, comportement) a été effectué trois fois par semaine. Lorsque le volume tumoral atteint 200 mm^3 , les souris reçoivent des doses journalières soit de saline, soit HCQ (60 mg/kg), soit vincristine (0.4 mg/kg) soit une combinaison d'HCQ (60 mg/kg) et vincristine (0.4 mg/kg) durant 5 jours consécutifs.¹⁶⁷ Les souris ont été euthanasiées une fois que la tumeur ait atteint la taille limite (2500 mm^3) ou 10 jours après la fin du traitement. Le volume tumoral a ensuite été mesuré utilisant la formule suivante : $\text{volume} = 1/2 (\text{longueur} \times \text{largeur}^2)$. Les tumeurs ont été fixées dans le formol pour des analyses immunohistochimiques.

La suite de la section Matériel et Méthodes est décrite dans l'article suivant.

Chapitre 6: Article

Cette section présente les résultats de recherche effectués dans le contexte de ce mémoire. Ils sont présentés sous la forme d'un article scientifique soumis au journal *Cancer Research* et évalué par un comité de pairs.

Autophagy is correlated with chemoresistance in neuroblastoma

Assila Belounis^{1,3}, Carine Nyalendo⁷, Roxane Le Gall², Tina V. Imbriglio², Mohammed Mahma², Pierre Teira⁴, Mona Beaunoyer⁵, Anne-Monique Nuyt², Nicole Leclerc³, Sonia Cournoyer^{1,2}, Elie Haddad², Gilles Vassal⁶, Hervé Sartelet^{1,3}

1. Department of pathology and cytogenetic, CHU Sainte Justine, Université de Montréal, Montreal, Canada
2. Research center, CHU Sainte Justine, Montreal, Canada
3. Department of pathology and cellular biology, Université de Montréal, Montreal, Canada
4. Division of paediatric oncology, CHU Sainte Justine, Université de Montréal, Montreal, Canada
5. Department of surgery, CHU Sainte Justine, Université de Montréal, Montreal, Canada
6. Department of paediatric oncology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France
7. Department of biochemistry, CHU Sainte Justine, Université de Montréal, Montreal,

Short title: autophagy in neuroblastoma

Key words: autophagy, neuroblastoma, chemoresistance, AKT pathway, hydroxychloroquine.

Abstract

Neuroblastoma (NB) is a frequent paediatric tumor characterized by a broad spectrum clinical behavior, with spontaneous regression and maturation, whereas the majority of tumors progress despite intensive multimodality treatments. Autophagy, a self-degradative process in cells, could be induced by chemotherapy and be associated with chemoresistance. The aim of this study was to determine if autophagy is present in NB, if chemotherapy modified its levels and whether its inhibition decreased chemoresistance. In order to verify the expression of LC3, a specific marker for autophagy, and Beclin 1, a positive regulator of autophagy, an immunohistochemical study was performed on samples from 184 NB patients. An *in vitro* study with six NB cell lines and six drugs (temozolomide, LY294002, syrolimus, vincristine, doxorubicin and cisplatin) was also performed. An inhibition of autophagy assay was performed using ATG5 knockdown cells and hydroxychloroquine (HCQ). Cell survival was measured using the MTT cell proliferation assay. Autophagy was detected by monodansylcadaverine and by Western-blot. *In vivo* study of ATG5 knockdown tumor xenografts in NSG mice was performed. Autophagy, detected through LC3 was present at low levels in NB and was not a prognosis factor while Beclin1 was highly expressed in children with bad NB prognosis. However, autophagy levels increased after chemotherapy *in vitro* and *in vivo*.

To summarize, autophagy is present in NB induced by chemotherapy and associated with chemoresistance which is significantly reduced by its inhibition. Therefore, targeting autophagy represents a very attractive approach to develop new therapeutic strategies in NB.

Introduction

Neuroblastoma is the most common and deadly extracranial solid tumor in children. Accounting for 12% of childhood cancer mortality, it is the leading cause of cancer deaths in children between one and four-years old.^{1,2} Survival of children older than one year of age with advanced NB is poor (only 34%), despite aggressive treatments.^{3,4} While high-dose chemotherapy with autologous haematopoietic stem cell transplantation has been proposed⁵ and can significantly improve the prognosis of metastatic NB, as shown in a large randomised trial⁶, this treatment carries with it a high risk of adverse effects.⁴ Poor global survival and resistance to high-dose chemotherapy indicate that a major problem in the treatment of NB is chemoresistance.⁷ Therefore, there is an urgent need to develop new therapeutic strategies in order to improve the outcome in children with advanced disease.

Autophagy is an ubiquitous self-degradation process that involves the degradation and recycling of cellular cytoplasmic constituents through the lysosomal pathway. Damaged or misfolded proteins or organelles are first sequestered in double-membrane vesicles known as autophagosomes, before fusing with lysosomes, where their contents are degraded by lysosomal proteases.⁸⁻¹⁰ Autophagy is a complex and multistep process involving the autophagy-related proteins (ATG).⁸ First, autophagic cargos (containing proteins aggregates and organelles) are enclosed by the phagophore (a double de novo membrane), a step that requires the class III regulator proteins: PI3K and Beclin-1. Then, in order to elongate the phagophore, LC3-I (ATG8) is cleaved into LC3-II by ATG4 and conjugated to phosphatidyl-ethanolamine (PE), then recruited to the phagophore together with ATG9

and the ATG16-ATG5-ATG12 complex. ATG5 is a protein involved in the early stages of autophagosome formation. It plays an essential role in the maturation of autophagosomes, with assistance from LC3.⁸ ATG5 null mutant cells demonstrate the indispensable role of this protein in autophagosome formation.¹¹ Upon vesicle completion, most of the ATG proteins, except LC3-II, dissociate from the autophagosome allowing for its fusion with lysosomes and subsequent cargo degradation by lysosomal proteases. Low levels of autophagic activity are commonly observed under normal conditions, presumably preserving normal cellular homeostasis.^{12,13} Prolonged autophagy may result in type 2 (autophagic) programmed cell death.^{12,14} The activation of autophagy is measured by the ratio between LC3-II on the membrane and LC3-I in the cytoplasm which can be detected by Western-blot¹⁵ or by immunohistochemistry.¹⁶ Beclin 1 is also a marker and a positive regulator of autophagy.

The regulation of autophagy by the PI3K/AKT pathway is very complex. Recently, a phosphatidylinositol ether lipid analogue that inhibits AKT activation was reported to induce autophagy with radiosensitizing effect.¹⁷ Autophagy is regulated by both class I and class III PI3K pathways.^{18,19} mTOR serves as a metabolic sensor that coordinates cross talk between nutrient availability and autophagy.¹⁹ On the other hand, class III PI3K in conjunction with Beclin positively regulates autophagy.

In cancer, autophagy plays a dual role by either activating cell death and inhibiting tumor progression or promoting cell survival.²⁰ In the early stages of carcinogenesis, autophagy acts as a primary tumor suppressor and inhibits tumor progression.²¹ In transplanted mouse tumor models, prolonged autophagy induces genome instability and significant

tumor cell death with inflammation.⁸ In the later stages, where the tumor is already well established, autophagy contributes to cancer cell survival in the presence of nutrient deprivation and low oxygen, particularly in the central region of solid tumors which is poorly vascularised. Moreover, autophagy can confer tumor cells with the ability to resist to ionizing radiation²² as well as to chemotherapy.²³

The observation of increased cell survival associated with higher autophagy activity following therapy has led to the development of strategies combining autophagy inhibitors to current anticancer treatments. In this context, chloroquine (CQ) or its derivate hydroxychloroquine (HCQ), sensitize tumor cells to anticancer therapies. Indeed, CQ and HCQ block the processing and maturation of autophagy vacuoles (autophagolysosomes) by inhibiting lysosomal activity.²³ Thus, HCQ and CQ inhibit specifically the last stage of autophagy without affecting the previous stage. Some data suggest that autophagy inhibition and autophagosome accumulation both contribute to the accelerated cell death induced by HCQ.²³

Here, we show firstly that autophagy is present in NB and this basal level is correlated with activation of the AKT pathway but is not associated with bad prognosis. Secondly, we study autophagy modulation by several drugs including classical drugs used in treatment of NB and AKT pathway inhibitors. Finally, we demonstrate that inhibition of autophagy by either ATG5 shRNA or HCQ induces chemosensitivity in NB.

Material and methods

Study design and patients

Study cases were selected upon the following inclusion criteria; (1) a diagnosis of NB had been made between July 1988 and March 2008, (2) written consent had been obtained from the patients, and (3) adequate specimen material had been collected for study purposes. 184 patients with NB were included in our study. The patients were treated and followed up at CHU Sainte-Justine (Montreal, Canada). Thirty one out of the 184 total NB cases were identified from routine provincial (Quebec, Canada) mass screening efforts. Tumors were classified according to the International Neuroblastoma Staging System (INSS).²⁴ Treatment was assigned according to the risk group on the basis of the patient's age at time of diagnosis, the INSS stage, the histoprognosis, the ploidy and *MYCN* amplification status. With formalin-fixed and paraffin-embedded samples, a tissue microarray (TMA) was constructed using four representative NB tumor tissue cylinders with a 0.6 mm diameter transferred into a recipient paraffin block using a tissue-arrayer. TMA blocks contained not only 184 primary tumors but also 47 paired metastases (42 lymph nodes and 5 hepatic metastases). For 18 tumors, fixed and paraffin-embedded samples were included in TMA and proteins coming from the lysate of frozen samples were tested by Western blot.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on sections of the TMA blocks or of tumors developed in the mouse model. The Ultraview Universal DAB detection kit (Ventana,

Ventana medical system, Tuscon, AR) was used. Antibodies against phospho-AKT (1/100, rabbit polyclonal, S473-r, Santa Cruz biotechnology, CA), phospho-mTOR (1/100, rabbit monoclonal, 49F9, Cell Signaling, CA), LC3 (1/1000, rabbit polyclonal, ab51520 abcam) or Beclin 1 (1/250, rabbit polyclonal, ab55878 abcam) were applied for 30 min. It was then followed by the application of the Ultraview Universal DAB detection kit. DAB was used as a chromogen and hematoxylin as a counterstain. Normal mouse or rabbit IgG at the same concentration as the primary antibody were used as negative controls. Two investigators blinded for clinical data independently evaluated immunostaining in samples containing more than 100 NB cells. Immunostaining scores were established by a semi-quantitative optical analysis of assessing the percentage of positive cells in each sample: 0 = all cells negative, 1+ = 1 to 25%, 2+ = 26 to 50%, 3+ = 51 to 75% and 4+ more than 76% of positive tumoral cells.

TUNEL

On sections of TMA, a terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay (*In situ* cell death detection kit, POD (Roche)) was used to identify double-stranded DNA fragmentation, characteristic of DNA degradation due to apoptosis. Briefly, tissue slides were deparaffinized and quenched in 2.0% hydrogen peroxide. The slides were then treated with 0.1 % de Triton X-100 (Sigma, X-100) for 8 min at room temperature. After rinsing in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), specimens were incubated in 1× equilibration buffer for approximately 10–15 s. The slides were then incubated with terminal deoxynucleotidyl transferase (rTdT) for 1 hr at 37°C,

blocked with a stop/washing buffer, and incubated with peroxidase-conjugated anti-digoxigenin antibody for 30 min at room temperature. Finally, the slides were stained with diaminobenzidine (DAB; Promega). Nuclear staining by methyl green was performed as the counter-stain. Slides were scanned using a customized, computer-controlled microscope (Axio Imager M1; Zeiss, Oberkochen, Germany) with xy-stage and z controller. Images of each spot were automatically acquired with a high-resolution camera (AxioCam HRC; Zeiss). Using these images, the Axiovision 4.6 (Zeiss) then allowed distinction between cells with nuclear TUNEL and negative cells containing only methyl green counterstaining. The percentage of positive neuroblasts for TUNEL was also calculated by dividing the number of stained nuclei by the total numbers of neuroblasts and multiplying by 100. The areas without neuroblasts were not analyzed.

Cell lines

Six NB cell lines were studied: SK-N-DZ (ATCC), SK-N-SH (ATCC), SK-N-FI (ATCC), N91-IGR and NB8-IGR cells from Gustave Roussy Institute (Villejuif, France), and NB-10 (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA). *MYCN* amplification is present in NB-10, SK-N-DZ and N91-IGR cells. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Knockdown of ATG5 expression by lentivirus-delivered shRNA

ATG5 and eGFP shRNA containing vectors were obtained from Open Biosystems (ATG5: accession #NM_004849, eGFP: accession # RHS4459). A lentiviral vector was made using HEK 293T cells by PEG (polythylenimine linear, Polysciences inc) transfection of purified ATG5 and eGFP shRNA plasmid, pMDL (virus packaging vector), Rev and VSVG plasmids. To generate human ATG5-knockdown cells, N91-IGR cells were transduced with lentivirus expressing shATG5 or sheGFP for control. Transduced cells were cultured in fresh medium for 2 days before selection for stable expression of the shRNA by growing in culture media containing puromycin (5 μ g/mL) for at least 2 weeks.

ptfLC3 transfection and confocal microscopy

IGR-N91 cells were seeded at 4×10^5 /well into eight-well chamber slides (Thermo scientific, Rochester, NY) to achieve 70% confluence. After 24h, the cells were transfected with the monomeric red fluorescence protein (mRFP)-GFP tandem fluorescent-tagged LC3 expression plasmid (ptfLC3)²⁵, using X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche Applied Science, Hague Road, IN) according to the manufacturer's instructions. At 48hr post transfection, the medium was changed to DMEM, 1% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin containing or not HCQ (30 μ M) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. After 72 hr, cells were fixed with 3% paraformaldehyde in PBS for 15 min, followed by permeabilization with 0.1% Triton X-100 for 5 min. After blocking in 3% BSA/1 x PBS for 30 min, the slides were incubated with Hoechst 33258 (Invitrogen, Eugene, OR), a nuclei counterstain. After 5 min incubation, the slides were washed three

times with PBS and visualized with the Ultraview Vox Confocal Imaging System (Perkin Elmer).

Study of cell survival and autophagy

Cell proliferation assay

Cell viability was determined by the MTT test. Cells were plated in a 96-well culture plate at a density of 5×10^3 /well over night. The cells were treated with various conditions for 24 hr then proliferation was measured by the (3-[4,5dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) MTT cell proliferation assay (Cell Titer 96 Non-Radioactive Cell proliferation Assay, Promega) according to manufacturer's instructions. Absorbance was measured at 570 nm using the Spectra Max 190 microplate spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Assays were performed in triplicate. Relative cell viability (percent of control) was calculated using the equation: (mean OD of treated cells/mean OD of control cells) x 100. For each time point, the treated cells were compared with control cells that had been treated with vehicle only.

Monodansylcadaverine (MDC) test

To correlate cell survival with the presence of autophagic vacuoles, cells were incubated with the autofluorescent agent monodansylcadaverine (MDC) at 0.05mM in PBS (Sigma) for 10 minutes at 37°C. MDC has been reported to specifically label autophagic vacuoles. MDC was then replaced with 200 μ l of PBS and finally replaced by 100 μ l of Tris-Triton

(Tris 10 mM pH 8.0, 0.1% Triton X-100). Fluorescence was measured with EnVision 2104 multilabel reader (Perkin Elmer) with an emission filter of 525 nm at 380 nm.

Cell treatments

The MTT and MDC tests were performed on cell lines with or without transfection of ATG5 shRNA vector and treated with different concentrations of drugs for 24 hr at 37°C. Drugs currently used in the treatment of NB were added at the following concentrations: temozolomide (Schering Plough inc, 0.1-1000 μ M), vincristine (Mayne Pharma USA inc, Paramus NJ, 1-10 000 nM), doxorubicin (Pfizer Inc Kirkland, Canada, 0.005-50 μ M) and cisplatin (Mayne Pharma USA inc, Paramus NJ; 0.015-150 μ g/ml), LY294002, specific inhibitor of AKT (Calbiochem Darmstadt, Germany, 0.05-500 μ M) and rapamycin, specific inhibitor of mTOR (Pfizer Inc Kirkland, Canada 0.1-1000 nM). To determine whether hydroxychloroquine (HCQ) could modify the sensitivity of cell lines to vincristine and doxorubicin, cells were treated with varying concentrations of cisplatin (0.15- 75 μ g/mL) and doxorubicin (0.005-5 μ g/mL) in the presence and absence of HCQ (30 μ M) for 48 hr. The compound concentrations resulting in 50% inhibition of cell viability (IC_{50}) were determined using Graphpad Prism 6 software.

Western Blot

Protein extracts were prepared from cells from frozen tumor tissues from 18 patients and cultured cell lines. Equal amounts of protein (20 μ g) from cell lysates were solubilized in Laemmli sample buffer, boiled for 5 min, separated by SDS-PAGE, transferred onto

polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes, blocked 1 hr at room temperature with TBS buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) containing 3% bovine serum albumin, and incubated with primary antibody overnight at 4°C. Immunoreactive bands were revealed following 1 hr incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies, and the signals were visualized with an enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (PerkinElmer, Waltham, MA). The primary antibodies used for this study were : anti-ATG5 1/1000 (2630 Cell Signaling), Beclin 1 (1/1000) (ab55878, Abcam Inc.), Cleaved Caspase-3 1/1000 (9664 Cell Signaling), LC3B 1/3000 (ab65041, abcam), AKT 1/300 (sc-5298, Santa Cruz Biotechnology), pAKT 1/500 (sc-7985-R, Santa Cruz Biotechnology), PTEN 1/500 (A2B1, Santa Cruz Biotechnology) or b-actin 1/3000 (sc-69879, Santa Cruz Biotechnology). A densitometry analysis with the Kodak ID 3.6, allowed to calculate the relative expression of Beclin 1 and the ratio between LC3-II and LC3-I.

Animal experiments

NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice (NSG) were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). The protocol was approved by the Sainte-Justine Research Center's Good Laboratory Practices for Animal Research (GLPAR) institutional committee (Protocol #509). All mice were housed under pathogen-free conditions in the animal facility and received sterilized water and diet. NSG mice were 7 weeks old at time of experiments. First, 5×10^6 of N91-IGR transduced cells with a lentivirus expressing a shRNA against ATG5 gene or control plasmid (eGFP shRNA) were injected

subcutaneously (s.c.) in the right flank. Mice were monitored twice a week for tumor growth. Clinical monitoring of mice (weight, vital signs, behaviour and abdominal palpation) were carried out once a week. When the palpable tumor reached 200 mm³ (measured with calipers), a dose of vincristine (0.4 mg/kg) was injected daily for 5 consecutive days.⁹ Control mice received (100 µL) of saline solution per day.

Secondly, SK-N-DZ and NB-10 cells were suspended in phosphate-buffered saline (PBS) at 50 x 10⁶ cells/mL. Five millions of cells (100 µL) were injected s.c. in the left flank. Mice treated with cisplatin (Mayne Pharma, Canada) i.p. at 8 mg/kg or with temozolomide orally at 100 mg/kg from day 10 to 13 post NB injection. Mice receiving PBS at the same time were used as a negative control. In both experiments, mice were euthanized 10 days after the end of treatment or when tumor size reached 2500 mm³. On tumors collected, immunohistochemistry with LC3 antibody were performed.

Statistical analysis

Association tests were performed with the Student's t-test. Spearman correlation values (rho) were used to compare the expression between LC3B, Beclin1, pAKT, PTEN, pmTOR in all NB studies. Statistical analyses were performed using Graphpad Prism 6 software. p values of less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

Results

Characteristics of patients

Clinicopathological characteristics of the 184 patients and tumors are detailed in **Table 1**. These patients had a median follow-up period of 67 months (range newborn-174 months) and a median age at diagnosis of 26 months (range, newborn to 151 months).

Autophagy and neuroblastoma

The analysis of LC3 immunostaining clearly showed two types of positivity: the first was diffuse in the cytoplasm corresponding to LC3 I (**Fig. 1Aa**) and the second was more concentrated in the cytoplasmic and perinuclear regions and specific to LC3 II and autophagy (**Fig. 1Ab**). We only considered the second type of positivity for autophagy analysis. Further, autophagy (LC3 II) was frequent in NB (80% of the tumors) but with a very low intensity (mean intensity 0.83). These data were confirmed by Western-blot analysis where LC3 II expression was found in 12 out of 18 tumors (66.6%) (**Fig. 1B**).

Beclin 1 was widely distributed within the NB (**Fig. 1Ac**). Tumor cells showed negative nuclei and a moderate-to-strong cytoplasmic positivity for Beclin 1. It was also expressed in a majority of the tumors (83%) but with a low intensity (mean intensity 1.03) (**Table 1**). These data were confirmed by Western blot analysis; we found beclin1 expression in 17 out of 18 tumors (94%) (**Fig. 1B**).

No relationship could be drawn between the expression of LC3II and the clinical variables. The only significant difference found was between LC3II expression in stage 4S (mean intensity 0.34) and stage 4 (mean intensity 1.12) (**Table 1**). This data was confirmed by

Western blot, where LC3II was undetectable in specimen from Stage 4S patients. Interestingly, the level of autophagy (positivity of LC3II) was inversely correlated with the level of apoptosis (TUNEL), particularly in stages 4 and 4S (**Fig. 1C**). These data were also confirmed by Western blot with higher apoptosis levels in stage 4S than in stage 4 evaluated by caspase 3 expression, but lower autophagy levels detected through the ratio LC3II/LC3I (**Fig. 1C** and **Fig. 1D**). However, expression levels of Beclin1 were significantly higher in patients older than one year at diagnosis compared to younger patients ($p < 0.001$) (**Table 1**). This protein was significantly more expressed in primary tumors than in metastasis ($p < 0.01$) and in standard NBs than in tumors coming from mass screening ($p < 0.001$) demonstrating that Beclin is highly expressed in NB tumors with poor prognosis. Among the major proteins present in the AKT pathway, there was a significant negative correlation between LC3 II and pmTOR ($\rho = -0.22$, $p < 0.01$) as well as pAKT ($\rho = -0.22$, $p < 0.01$) and between Beclin 1 and pAKT ($\rho = -0.13$, $p < 0.01$) suggesting that autophagy is activated through AKT pathway inhibition.

Chemotherapy induces autophagy in neuroblastoma cells

Cell survival rate detected by MTT and the formation of autophagosomes revealed by MDC indicate a significant increase of autophagy following treatment with increasing concentrations of classical chemotherapeutic drugs used for the treatment of NB (cisplatin, vincristine and doxorubicin) (**Fig. 2A**) with higher levels after cisplatin treatment. Temozolomide in NB cell lines didn't induce high levels of autophagy even at high concentrations. AKT pathway inhibitors, such as LY294002 and rapamycin, were the most

efficient, resulting in high autophagy levels (**Fig. 2A**). Increasing chemotherapy concentration enhances cell death and autophagosome formation. Following an IC50 concentration treatment, autophagy increased with all drugs in the four cell lines, independently to *MYCN* amplification (**Fig. 2B**). Immunoblotting analysis confirmed that increased autophagy was dose-dependent after treatment with temozolomide (TMZ) or LY294002 (LY) which was correlated with a decrease of pAKT and pmTOR expression. Beclin 1 did not seem to increase after TMZ or LY treatment (**Fig. 2C**). Expression of AKT and PTEN was not modified by the treatment and also did not correlate with autophagy. The induction of autophagy by chemotherapy was also found *in vivo* experiments with strong LC3II positivity in tumors of NSG mice injected with SK-N-DZ and treated with cisplatin or NB-10 treated with temozolomide (**Fig. 2D**).

Inhibition of autophagy sensitizes NB cells to chemotherapy

Transfection efficiency with lentivirus-based short hairpin RNA for *ATG5* knockdown (*ATG5^{kd}*) was confirmed by Western blot and by a MDC test showing respectively no *ATG5* or reduced LC3II expression (**Fig. 3A**) and no autophagy activity for *ATG5^{kd}* cells when treated with increasing concentrations of vincristine compared to their control, sheGFP cells (**Fig. 3B**). *ATG5^{kd}* cells were significantly more sensitive to vincristine, doxorubicin or cisplatin than sheGFP cells (**Fig. 3C**), suggesting that autophagy contributes to chemoresistance in NB.

HCQ inhibits autophagy and sensitizes NB cells to chemotherapy

An increase of the LC3II/LC3I ratio in cells treated with increasing HCQ concentrations (5, 10, 20 and 30 μ M) compared to control cells was observed by Western blot since HCQ treatment results in an accumulation of autophagosomes due to an inhibition of the late stage of autophagy (**Fig. 4A**). To confirm these data, we transfected NB8-IGR cells with ptfLC3 (LC3-GFP-RFP). In normal conditions, where autophagy is functional, only the RFP signal (red puncta) is visible whereas the GFP signal is eliminated by lysosomal proteases. Once autophagy is blocked by HCQ, both the RFP and GFP (yellow: red and green puncta) are visible in autophagosomes, which confirms that there is no fusion between autophagosome and lysosomes (**Fig. 4B**). We also used MDC, a lysotropic fluorescent compound that accumulates in acidic autophagic vacuoles. As expected, the results showed a significant increase of the autofluorescent substance in SK-N-DZ, N91-IGR and NB8-IGR cell lines when treated with HCQ 30 μ M compared with non treated cells (**Fig. 4C**).

HCQ at 30 μ M inhibits autophagy but does not induce cell death, since no significant difference in cell death was observed after HCQ treatment in SK-N-DZ, N91-IGR or NB8-IGR cells (**Fig. 4D**). The MTT test showed that cells treated with a combination of HCQ 30 μ M and vincristine (0.001 - 100 μ M) or doxorubicin (0.001- 100 μ M) were significantly more sensitive to chemotherapy than cells treated with vincristine or doxorubicin alone (**Fig. 4E**), confirming that HCQ induces an increase of NB cells sensitivity to chemotherapy. The MDC test also showed a dose-dependent increase of autophagosomes numbers in NB cell line after vincristine, doxorubicin or cisplatin treatment. This increase

was further enhanced by addition of HCQ, consistent with a late inhibition of autophagy and autophagosome accumulation by HCQ (**Fig. 4F**).

Autophagy inhibition by ATG5 knockdown in *in vivo* tumors

To establish the efficacy of chemotherapy on tumor developed from defective autophagy cells *in vivo*, we injected subcutaneously 5×10^6 *ATG5*^{kd} cells or control cells (sheGFP) in NSG mice. Interestingly, tumors developed in 11/12 mice injected with sheGFP cells versus only 3/12 in mice injected with *ATG5*^{kd} cells (**Table 2**). When tumors reached 200 mm³, mice received saline for the control group or vincristine (0.4 mg/kg/day) for 5 days. Then tumor progression was followed (**Fig. 5A**). In both groups, tumor size was less important in the treated group than in the non-treated one. At day 6, tumor xenografts derived from shATG5 responded better to vincristine (659.3 mm³) than tumors derived from sheGFP xenografts (891.6 mm³) (**Fig. 5B**).

Discussion

Despite aggressive multimodal therapy, NB patients still have a poor prognosis which is partially due to chemoresistance of the tumor cells. Further, it has been reported that autophagy is a potential mechanism that promotes tumor cell survival and confers chemoresistance. In our study, we were interested in investigating whether autophagy was present in NB and whether it could be modulated by chemotherapy. Using immunohistochemistry and Western blot techniques on tumor samples from patients, we observed that autophagy is present at basal levels to maintain homeostasis. LC3 expression was not correlated to any clinical pathological data. Thus, LC3 is not a prognosis factor in NB. However, autophagy measured through LC3II expression was higher in stage 4 tumors than 4S. Furthermore, apoptosis detected by TUNEL and expression levels of caspase 3 were lower in stage 4 tumors than stage 4S which could explain the aggressive properties of stage 4 tumors compared to 4S. While LC3 appears not to be a prognosis factor in NB, Beclin 1 is a factor of poor prognosis as it is highly expressed in tumors from NB patients more than one year old. In other cancers, such as human hypopharyngeal squamous cell carcinoma (HSCC), expression of Beclin 1 and LC3II correlates with poor prognosis.²⁶ Additionally, other studies showed that autophagy predicts resistance to chemotherapy and survival in melanoma.²⁷ We also observed a negative correlation between LC3II and pAKT as well as pmTOR and between Beclin1 and pAKT suggesting that autophagy activation occurs after inhibition of the AKT pathway since the inhibition of mTOR activates autophagy.

To determine whether autophagy is activated after chemotherapy treatment, three chemotherapeutic agents used clinically for NB treatment were studied: vincristine, doxorubicin and cisplatin. Our data demonstrate that these three agents induce the formation of autophagosomes in NB. Also, the activation of autophagy by cisplatin and vincristine is dose-dependent. This is also observed with doxorubicin except in SK-N-FI cells in which autophagy was not increased by chemotherapy. These *in vitro* data were confirmed by an *in vivo* study that showed the activation of autophagy in NB tumors from mice receiving the cisplatin treatment compared to non-treated tumors. In other cancers, doxorubicin is known to be an inducer of the formation of autophagosomes in papillary thyroid cancer ²⁸, whereas cisplatin induced autophagy in esophageal squamous cell carcinoma cells. ²⁹ The four studied cell lines, SK-N-DZ, SK-N-SH, SK-N-FI and NB-10, have behavioural differences that could influence the results. SK-N-DZ and NB-10 have a *MYCN* gene amplification that renders them more aggressive compared to the other cell lines. In the presence of a chemotherapeutic agent, *MYCN* amplification is not modified. ³⁰ Other studies have showed that overexpression of *CMYC* strongly induces autophagy in rat 3Y1 fibroblasts. ³¹ Our data indicate that NB cell lines with amplified *MYCN* didn't show increased autophagy relative to other cell lines with non-amplified *MYCN*.

Temozolomide has been described as inducer of autophagy. ³² In the present study, temozolomide induces a dose dependent increase in autophagy detectable by MDC and by Western blot.

Similarly, the present study showed that LY294002 was a dose dependent activator of autophagy. This drug increases autophagy by inhibiting PI3K I, an element of the PI3K/AKT/mTOR inhibitory pathway to autophagy.³³

Rapamycin induces autophagy by inhibiting mTOR.³⁴ In the present study, an increase in autophagy detected by MDC was associated with treatment by rapamycin in the four studied NB cell lines. It has been described that in presence of rapamycin, the dephosphorylation of many proteins activates the transcription of ATG8 and ATG14 genes associated with autophagy.¹³

Western blot analysis showed no correlation between the expression of Beclin 1 and the increase in concentrations of temozolomide or LY294002. Beclin 1 has many cell functions including the induction of autophagosome formation and tumor suppressor.³⁵ It is a mediator of various cellular cascades, including autophagy, apoptosis and cell differentiation.³⁶ The association of certain genes of the Bcl-2 family with Beclin 1 inhibits the autophagy function of this gene by decreasing the amount of Beclin 1 partnering with a class III PI3K and activates its apoptotic function.³⁷ It is the positive regulation of Beclin 1 that induces the autophagic and differentiation cascades.³⁶ Also, Beclin 1 loses its autophagy function and induces apoptosis when there is an increased activity of caspase-9.³⁸ This caspase has the property of cleaving Beclin 1 and creating a C-terminal fragment promoting pro-apoptotic activity.³⁸ According to some studies, doxorubicin activates caspase-9 and positively regulates the expression of Beclin 1.³⁸ Consequently, this particular NB drug induces apoptosis.

Collectively, our data demonstrate that autophagy is activated in response to chemotherapy in NB cells but has not answered if this autophagy is an autophagy-mediated cell death or autophagy-mediated cell survival. To answer this question, we investigate the effect of combining chemotherapy and autophagy blockade. First, we knock-downed *ATG5*, an essential autophagy gene. It is well established that *ATG5* is required to initiate the autophagy process. *ATG5* knockdown cells were more sensitive to vincristine, doxorubicin and cisplatin at different concentrations compared to control cells. Also, a significant decrease in the number of tumor xenografts developed from *ATG5*^{kd} cells, was observed, and their increased sensitivity to vincristine compared to control cells demonstrate the strong effect of autophagy inhibition in sensitizing cells to chemotherapy.

Second, we used HCQ to target the late stages of autophagy by blocking the fusion of autophagosomes with lysosomes.³⁹ Our study showed that HCQ inhibits autophagy in NB cells. Evidence in literature suggests that HCQ induces cell death.⁴⁰ It has also been used alone in some clinical trials for treatment of pancreatic cancer, breast cancer, renal cell carcinoma or chronic lymphocytic leukemia.²³ In the present study, HCQ was used at concentrations that cause only autophagy inhibition and not directly cell death. Our data demonstrate, for the first time, that inhibition of autophagy using HCQ sensitizes NB cells to classical chemotherapy. SK-N-DZ, N91-IGR or NB8-IGR cells were strongly more sensitive to vincristine and doxorubicin when these were combined to HCQ supporting the idea that autophagy acts as a cytoprotective mechanism⁴¹ and its inhibition may promote apoptosis in cancer cells.⁴² Several studies and clinical trials have investigated autophagy inhibition using different pharmacological agents usually in combination with

chemotherapy, radiotherapy or other targeted anti-cancer therapies.⁴³ Some data demonstrated a significant increase in long-term survival when the treatment includes CQ.⁴⁴ Reports from clinical trials indicate that when CQ was added to conventional therapy, it seemed to improve mid-term survival for glioblastoma multiform patients.⁴⁵ Taken together these results confirm that autophagy promotes chemoresistance and its inhibition sensitizes NB cells to chemotherapy.

In conclusion, our study demonstrates that autophagy is present in NB tumors at a basal level. LC3 is not a prognosis factor unlike Beclin 1 which is a factor of poor prognosis. Autophagy is activated after chemotherapeutic treatment in NB cells. Autophagy inhibition demonstrates that autophagy confers chemoresistance in NB. The use of HCQ sensitizes cells to the conventional chemotherapy in NB treatment. Therefore, we propose that HCQ could be used as an adjuvant therapy in clinical trials to enhance the efficacy of chemotherapy in NB patients.

Grant support: This work was supported by a grant from the Fondation Centre de Cancérologie Charles-Bruneau.

References

1. Schwab, M., Westermann, F., Hero, B. & Berthold, F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* **4**, 472-80 (2003).
2. Canadian Cancer Society's Steering Committee: Canadian Cancer Statistics 2009. (2009).
3. Brodeur, G.M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* **3**, 203-16 (2003).
4. Maris, J.M. The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. *Curr Opin Pediatr* **17**, 7-13 (2005).
5. Park, J.R., Eggert, A. & Caron, H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Pediatr Clin North Am* **55**, 97-120, x (2008).
6. Matthay, K.K. *et al.* Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* **341**, 1165-73 (1999).
7. Maris, J.M., Hogarty, M.D., Bagatell, R. & Cohn, S.L. Neuroblastoma. *Lancet* **369**, 2106-20 (2007).
8. He, C. & Klionsky, D.J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* **43**, 67-93 (2009).
9. Klionsky, D.J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 931-7 (2007).
10. Reggiori, F. & Klionsky, D.J. Autophagosomes: biogenesis from scratch? *Curr Opin Cell Biol* **17**, 415-22 (2005).
11. Chen, D. *et al.* A mammalian autophagosome maturation mechanism mediated by TECPR1 and the Atg12-Atg5 conjugate. *Mol Cell* **45**, 629-41 (2012).
12. Eskelinen, E.L. & Saftig, P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 664-73 (2009).
13. Yang, Y.P., Liang, Z.Q., Gu, Z.L. & Qin, Z.H. Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin* **26**, 1421-34 (2005).
14. Yu, L., Strandberg, L. & Lenardo, M.J. The selectivity of autophagy and its role in cell death and survival. *Autophagy* **4**, 567-73 (2008).

15. Galluzzi, L. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* **16**, 1093-107 (2009).
16. Miracco, C. *et al.* Beclin 1 and LC3 autophagic gene expression in cutaneous melanocytic lesions. *Hum Pathol* **41**, 503-12 (2010).
17. Fujiwara, K. *et al.* Akt inhibitor shows anticancer and radiosensitizing effects in malignant glioma cells by inducing autophagy. *Int J Oncol* **31**, 753-60 (2007).
18. Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E.F., Meijer, A.J. & Codogno, P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem* **275**, 992-8 (2000).
19. Budanov, A.V. & Karin, M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* **134**, 451-60 (2008).
20. Shintani, T. & Klionsky, D.J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**, 990-5 (2004).
21. Turcotte, S. & Giaccia, A.J. Targeting cancer cells through autophagy for anticancer therapy. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 246-51 (2010).
22. Paglin, S. *et al.* A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* **61**, 439-44 (2001).
23. Yang, Z.J., Chee, C.E., Huang, S. & Sinicrope, F.A. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* **10**, 1533-41 (2011).
24. Brodeur, G.M. *et al.* International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* **6**, 1874-81 (1988).
25. Kimura, S., Noda, T. & Yoshimori, T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* **3**, 452-60 (2007).
26. Wang, J. *et al.* Aberrant Expression of Beclin-1 and LC3 Correlates with Poor Prognosis of Human Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE* **8**, e69038 (2013).
27. Ma, X.H. *et al.* Measurements of tumor cell autophagy predict invasiveness, resistance to chemotherapy, and survival in melanoma. *Clin Cancer Res* **17**, 3478-89 (2011).
28. Lin, C.I. *et al.* Autophagy: a new target for advanced papillary thyroid cancer therapy. *Surgery* **146**, 1208-14 (2009).

29. Liu, D., Yang, Y., Liu, Q. & Wang, J. Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Med Oncol* **28**, 105-11 (2011).
30. Aktas, S., Altun, Z., Erbayraktar, Z., Aygun, N. & Olgun, N. Effect of cytotoxic agents and retinoic acid on Myc-N protein expression in neuroblastoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **18**, 86-9 (2010).
31. Tsuneoka, M. *et al.* c-myc induces autophagy in rat 3Y1 fibroblast cells. *Cell Struct Funct* **28**, 195-204 (2003).
32. Kanzawa, T. *et al.* Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ* **11**, 448-57 (2004).
33. Xing, C., Zhu, B., Liu, H., Yao, H. & Zhang, L. Class I phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 activates autophagy and induces apoptosis through p53 pathway in gastric cancer cell line SGC7901. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **40**, 194-201 (2008).
34. Chang, Y.Y. *et al.* Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway. *Biochem Soc Trans* **37**, 232-6 (2009).
35. Pirtoli, L. *et al.* The prognostic role of Beclin 1 protein expression in high-grade gliomas. *Autophagy* **5**, 930-6 (2009).
36. Wang, J. Beclin 1 bridges autophagy, apoptosis and differentiation. *Autophagy* **4**, 947-8 (2008).
37. Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M. & Levine, B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* **30**, 678-88 (2008).
38. Furuya, D., Tsuji, N., Yagihashi, A. & Watanabe, N. Beclin 1 augmented cis-diamminedichloroplatinum induced apoptosis via enhancing caspase-9 activity. *Exp Cell Res* **307**, 26-40 (2005).
39. Ben-Zvi, I., Kivity, S., Langevitz, P. & Shoenfeld, Y. Hydroxychloroquine: from malaria to autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* **42**, 145-53 (2012).
40. Lagneaux, L. *et al.* Early induction of apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia cells by hydroxychloroquine: activation of caspase-3 and no protection by survival factors. *Br J Haematol* **112**, 344-52 (2001).
41. Shen, S. *et al.* Association and dissociation of autophagy, apoptosis and necrosis by systematic chemical study. *Oncogene* **30**, 4544-56 (2011).

42. Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A. & Kroemer, G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 741-52 (2007).
43. White, E. & DiPaola, R.S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res* **15**, 5308-16 (2009).
44. Liang, X. *et al.* Inhibiting systemic autophagy during interleukin 2 immunotherapy promotes long-term tumor regression. *Cancer Res* **72**, 2791-801 (2012).
45. Sotelo, J., Briceno, E. & Lopez-Gonzalez, M.A. Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* **144**, 337-43 (2006).

Tables and Figures

Table 1: Patients clinical data

Variable		LC3B				Beclin1			
	No (%)	No	%	Mean Intensity	p	No	%	Mean Intensity	p
All patients	184	148	80	0.83		153	83	1.03	
Age									
Median (Range), in months	26 (0-151)								
< 365 days	88 (48)	73	83	0.92		70	80	0.83	
≥ 365 days	96 (52)	74	77	0.75	ns	84	87.5	1.25	<0.01
Stage									
1	53 (29)	47	88	0.6	ns	48	90	1.30	ns
2	35 (19)	25	71	0.64		27	77	0.8	
3	23 (12)	21	91	0.94		20	86	1.14	
4	58 (32)	52	89	1.12		47	81	0.97	
4S	15 (8)	11	73	0.34	0.02	11	73	0.72	ns
MYCN status									
Amplified	14 (10)	13	87	0.81		11	73	0.87	
Non Amplified	127 (90)	103	81	0.50	ns	105	82	0.43	ns
Unknown	43								
Type of NB									
Standard	149 (81)	133	89	0.96		126	84	1.19	
Mass screening	35 (19)	29	82	0.8	ns	27	77	0.46	<0.001
Type of samples									
Primary tumors	184	148	80	0.83		153	83	1.03	
Metastases	47	41	87	0.78	ns	37	79	0.69	<0.01

Table 2: Effect of autophagy inhibition by ATG5 knockdown on tumors *in vivo*

Cells injected	Tumor Development	Tumor latency (days)	Treatment 5 days	Number tumors/group	Tumor volume (mm ³) at day 6
SheGFP Cells	11/12	34.5	Saline	6	1392.1
			Vincristine (0.4 mg/kg/day)	5	891.6
ShATG5 Cells	3/12	36.3	Saline	2	883.9
			Vincristine (0.4 mg/kg/day)	1	659.3

Figure legends

Figure 1. Evaluation of the level and the regulation of autophagy in NB and its correlation with apoptosis. **A**, First autophagy was evaluated in TMA sections from NB tumor samples by immunohistochemistry using antibodies anti-LC3 or anti-Beclin 1. The expression levels of pmTOR and pAKT, two autophagy-regulating proteins, were also studied on the same samples. Apoptosis was tested by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL). **B**, In the same way, immunoblotting analysis was performed on protein lysates from different frozen matched tumor samples with antibodies against either LC3 or Beclin-1 for autophagy and against-caspase 3 for apoptosis. **C**, According to the stage of tumors, the expression of LC3II and TUNEL positivity were then semi-quantified. **D**, Using tumor samples, the ratio LC3II/LC3I and cleaved caspase-3 expression were evaluated by densitometry.

Figure 2. Chemotherapy induces autophagy *in vitro* and *in vivo*.

The effect of chemotherapeutic agents on the autophagy of NB cell lines and tissues was analyzed. **A**, NB-10 cells were treated with increasing concentrations of temozolomide, rapamycin, cisplatin, vincristine, doxorubicin or LY294002 for 24h followed by MTT and MDC assays to measure cell viability and autophagy levels, respectively. Results are expressed as percentage of the corresponding control and represent mean \pm SEM of 3 independent experiments (***: $P < 0.001$). **B**, Cell viability and MDC specific autophagy were measured after IC50 treatment of different NB cell lines with chemotherapeutic agents. Results are expressed as percentage of the corresponding control and represent mean \pm SEM of 3 independent experiments (***: $P < 0.001$). **C**, Immunoblotting analyses were performed on protein lysates from NB-10 cells treated with temozolomide (TMZ) or LY294002 (LY) at IC50. Anti-LC3, anti-Beclin 1, anti-AKT, anti-pAKT, anti-pmTOR, anti-PTEN antibodies were used. β -actin was used as loading control. The ratio LC3II/LC3I expression was evaluated by densitometry. **D**, Tumor xenografts developed from SK-N-DZ or NB-10 cells were treated with cisplatin or temozolomide. Slides were immunostained with anti-LC3 antibodies.

Figure 3. Inhibition of autophagy sensitizes NB cells to chemotherapy. N91-IGR cells were transduced with ATG5-shRNA lentivirus to knockdown ATG5 gene expression and thereby inhibit autophagy or with eGFP-shRNA, used as a control. **A**, Protein immunoblotting using anti-ATG5 and anti-LC3 antibodies was performed to demonstrate ATG5 gene knockdown and LC3 expression on N91-IGR transduced cells. β -actin was used as loading control. **B**, A MDC test for autophagy was performed on N91-IGR cells with ATG5 expression or not, after treatment with vincristine increasing concentrations. **C**, Cell viability of shATG5 and control cells was measured with an MTT assay following treatment with increasing concentrations of vincristine, doxorubicin or cisplatin. Results are expressed as percentage of corresponding control and represent mean \pm SEM of 4 independent experiments (*: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$).

Figure 4. HCQ sensitizes NB cells to chemotherapy by inhibition of autophagy.

A, N91-IGR cells were treated with 5 to 30 μ M of HCQ and analyzed for LC3II and LC3I protein expression by immunoblotting. **B**, Immunofluorescence confocal microscopy analysis was done on transfected N91-IGR cells with RFP-GFP-LC3 treated 48h later with or without HCQ 30 μ M for 24h. (Bar 5 μ m). Cells treated with HCQ showed an increase in GFP puncta (green), indicating an absence of fusion between lysosomes and autophagosomes. **C**, Autophagy in SK-N-DZ, N91-IGR and NB8-IGR cells was measured by an MDC assay pre and post HCQ treatment (30 μ M). **D**, Cell viability, measured with an MTT assay, of SK-N-DZ, N91-IGR and NB8-IGR cells was determined pre and post HCQ treatment (30 μ M). **E**, SK-N-DZ, N91-IGR and NB8-IGR cell viability was measured after vincristine or doxorubicine treatment combined or not with HCQ (30 μ M). **F**, The autophagic activity of SK-N-DZ, N91-IGR and NB8-IGR cells was measured using a MDC agent after treatment with vincristine or doxorubicin in increasing doses, combined or not with HCQ (30 μ M). Results are expressed as percentage of corresponding control and represent mean \pm SEM of 4 independent experiments (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$).

Figure 5. Effect of autophagy inhibition by ATG5 knockdown on tumors *in vivo*

12 NSG mice received a s.c injection of 5×10^6 sheGFP cells and another 12, received the same number of shATG5 cells. 11/12 mice in the sheGFP group developed xenograft tumors whereas only 3/12 developed tumors in the shATG5 group. When tumors reached 200 mm^3 in size, mice were administered vincristine (0.4 mg/kg/day) or vehicle (saline) for 5 days. **A**, Progression of tumor volume was followed in each group from time of Vincristine or saline administration. Each data point represents the tumor volume mean \pm SEM from 6 sheGFP tumors and 1 or 2 shATG5 tumors. **B**, The tumor size of the four groups of mice was compared at day 6. Tumor size from the shATG5 group was reduced compared with tumors from the sheGFP group. Also, tumors derived from shATG5 cells were more sensitive to vincristine compared with the control cells (sheGFP).

A)

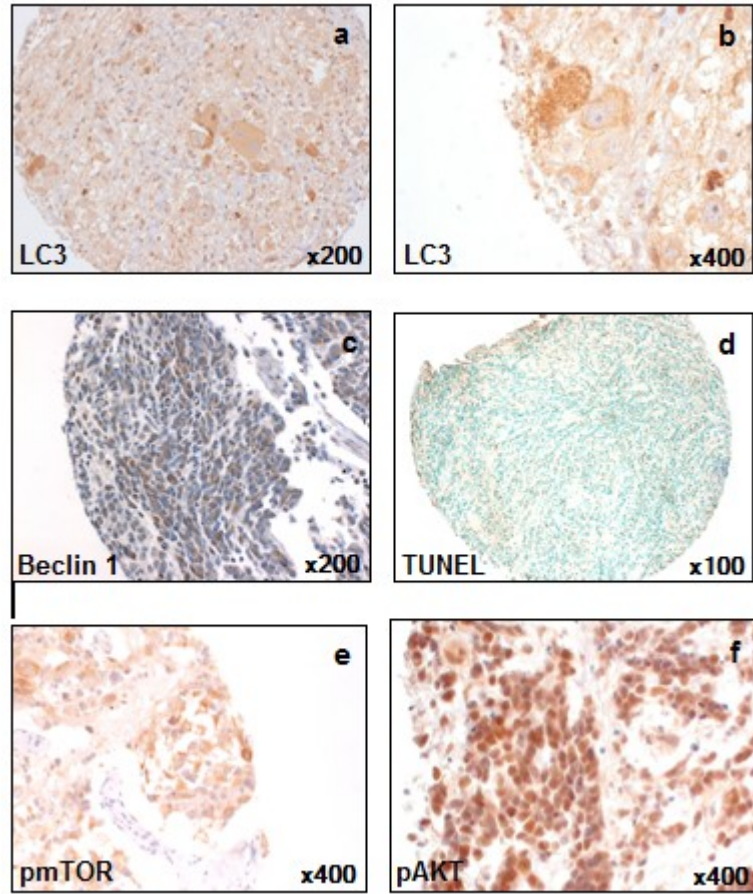
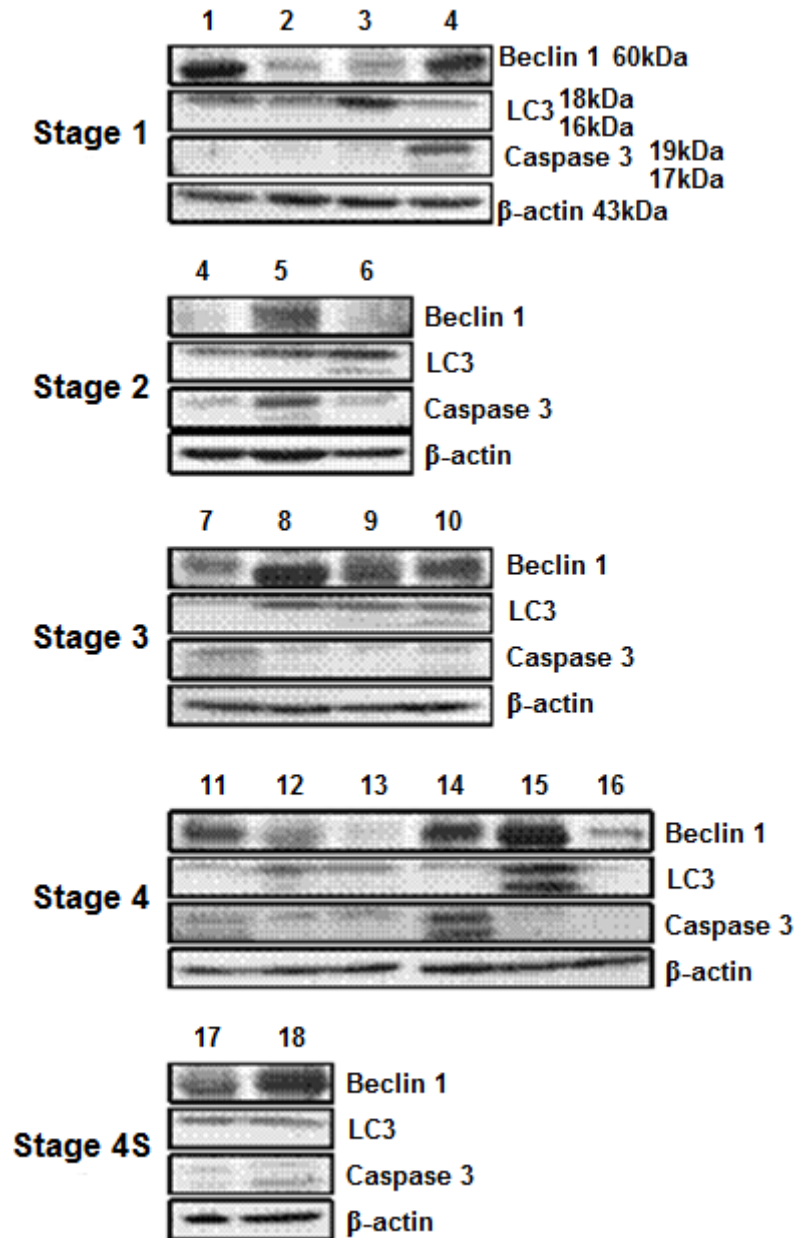
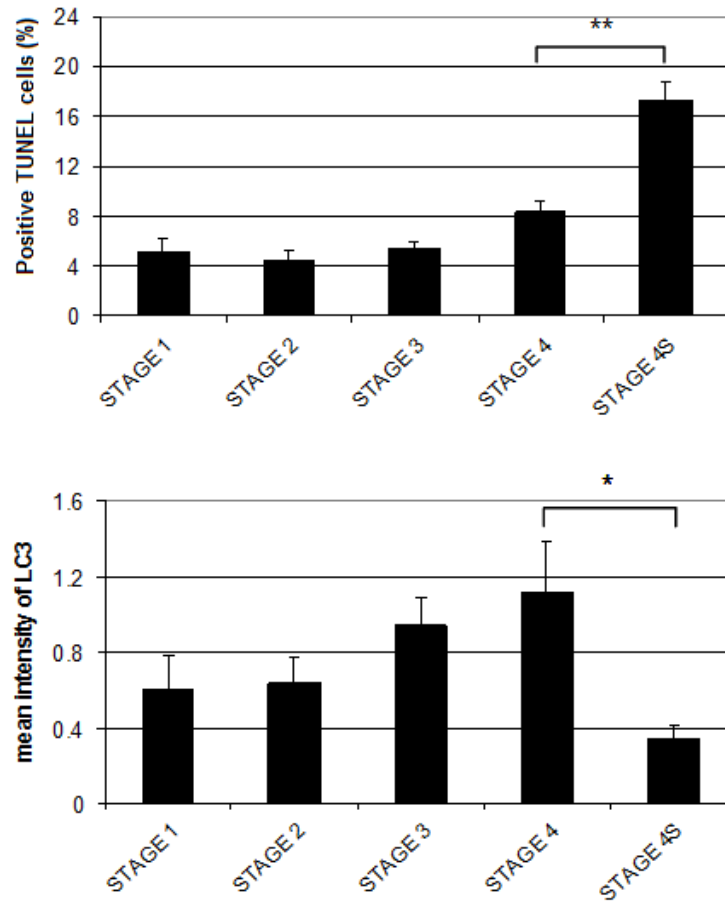


Figure 1 Belounis *et al.*

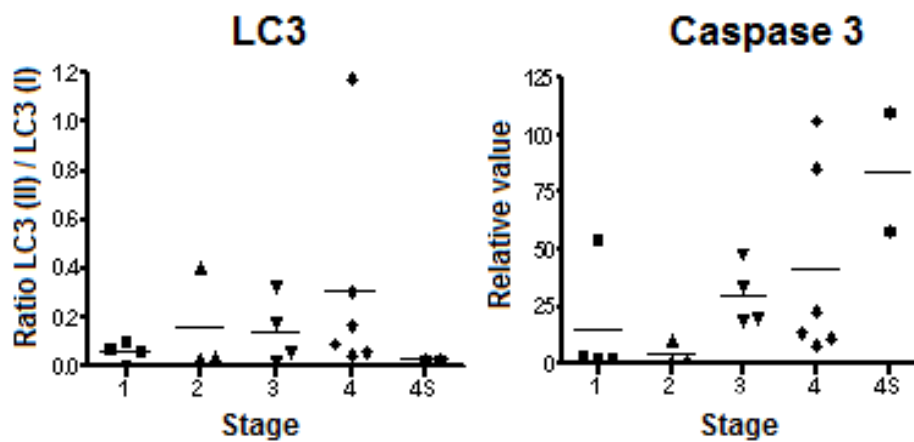
B)

Figure 1 Belounis *et al.*

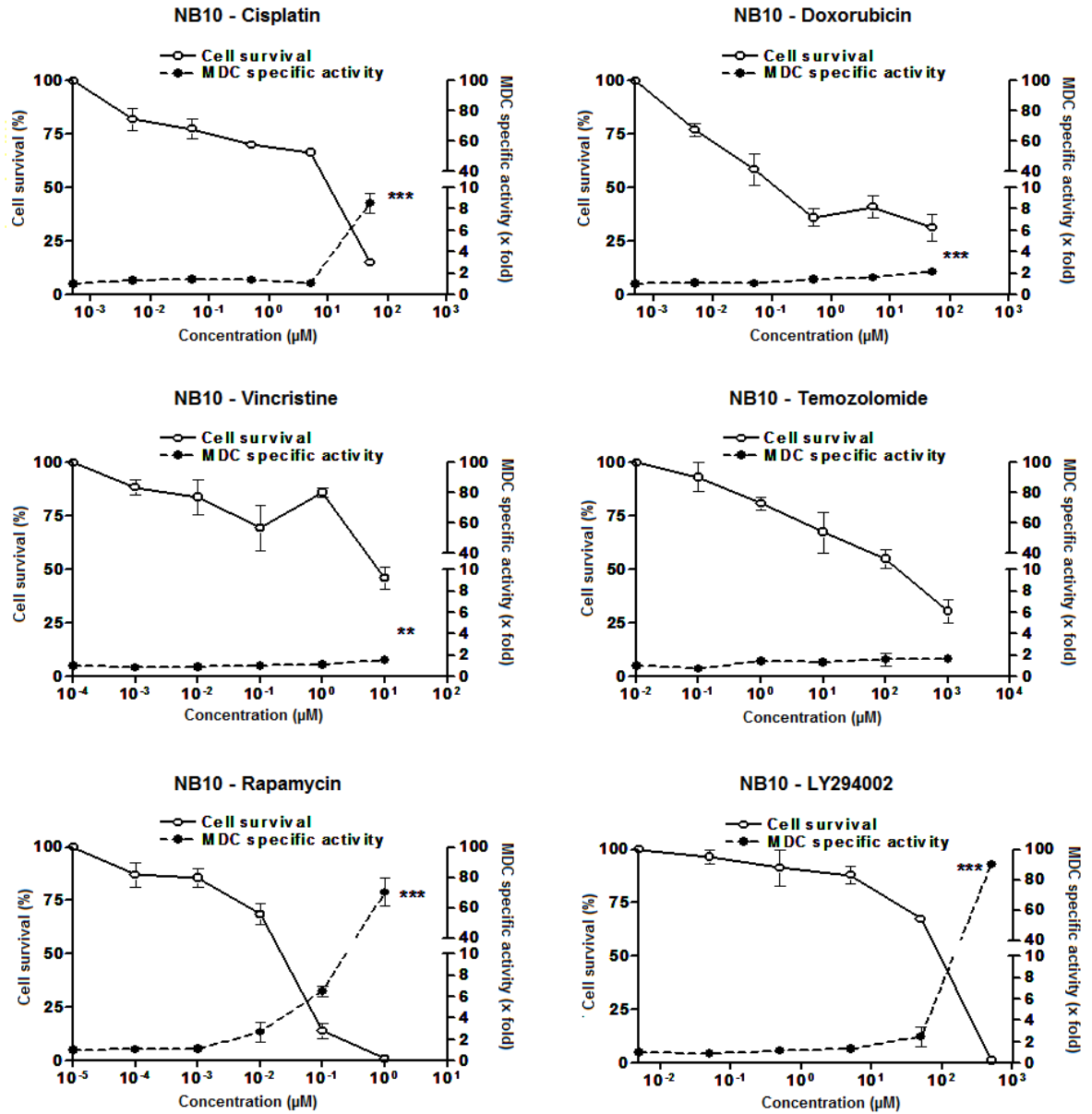
C)



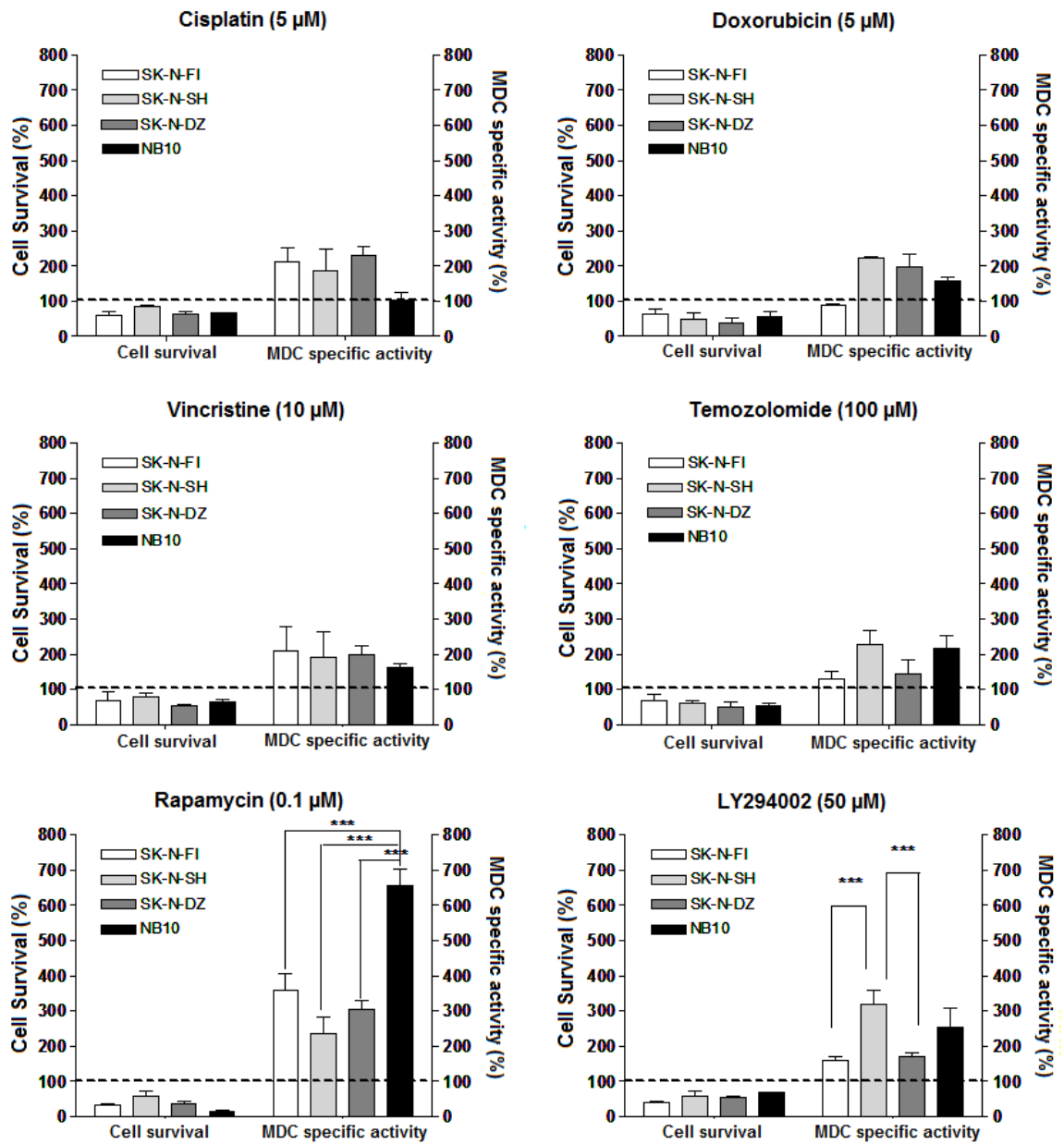
D)

Figure 1 Belounis *et al.*

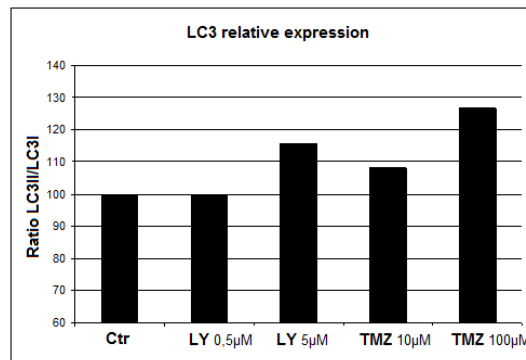
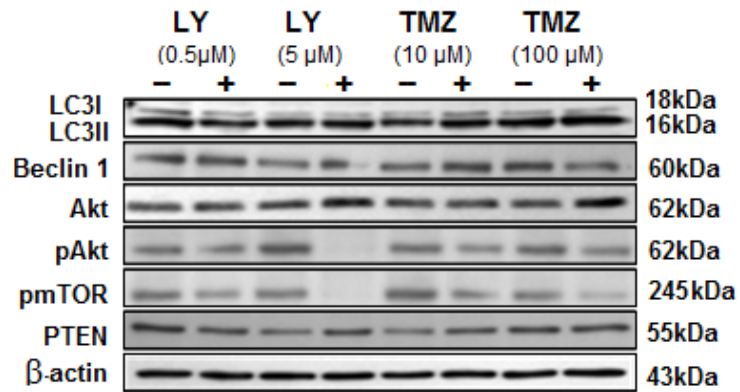
A)

Figure 2 Belounis *et al.*

B)

Figure 2 Belounis *et al.*

C)



D)

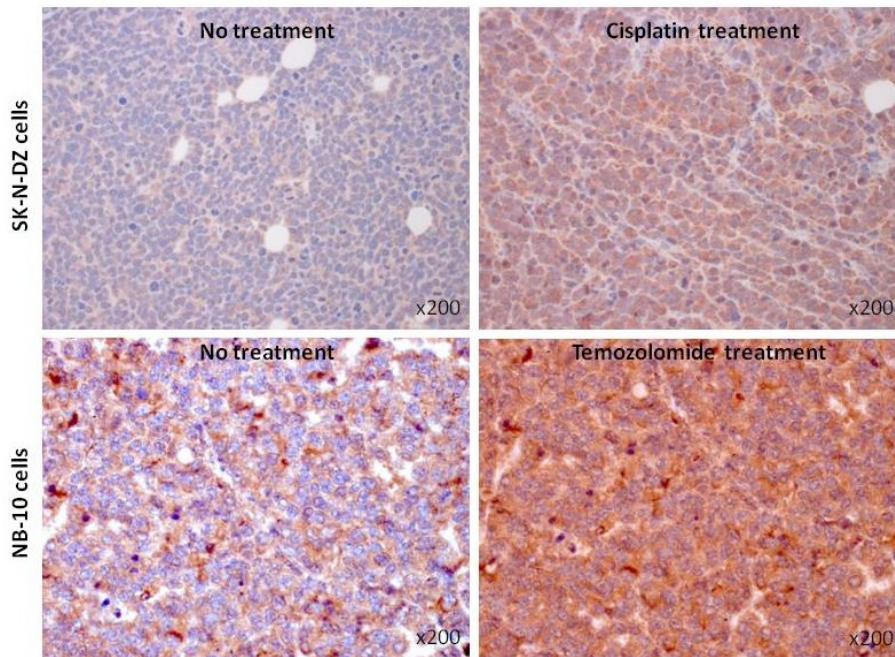
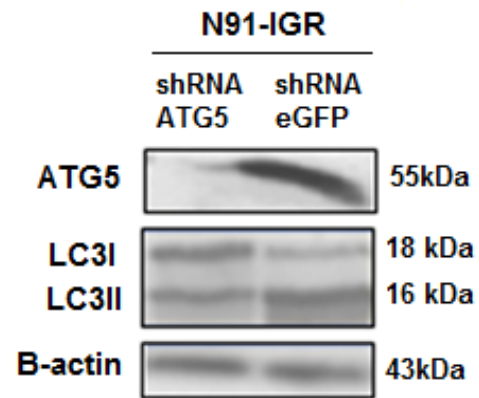


Figure 2 Belounis *et al.*

A)



B)

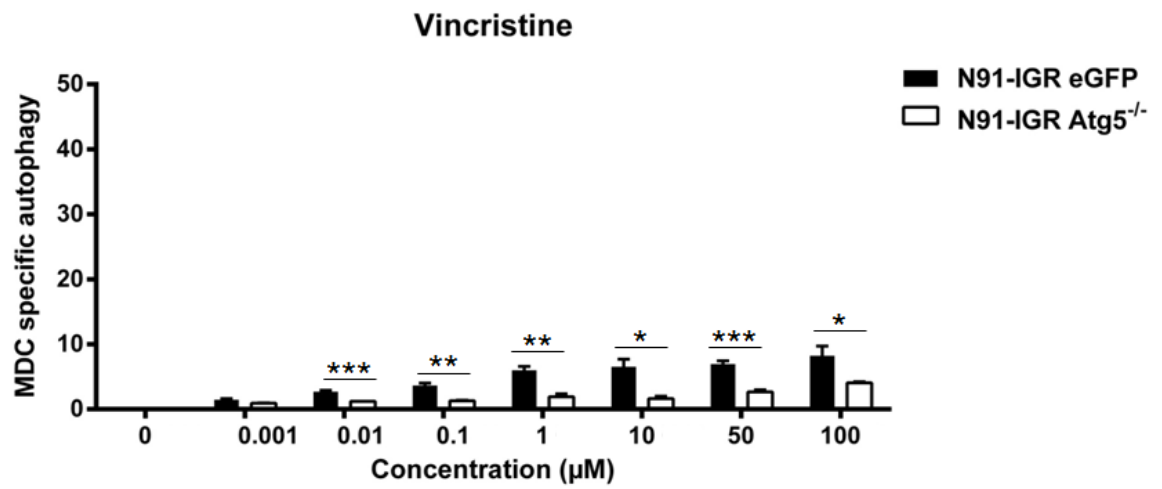
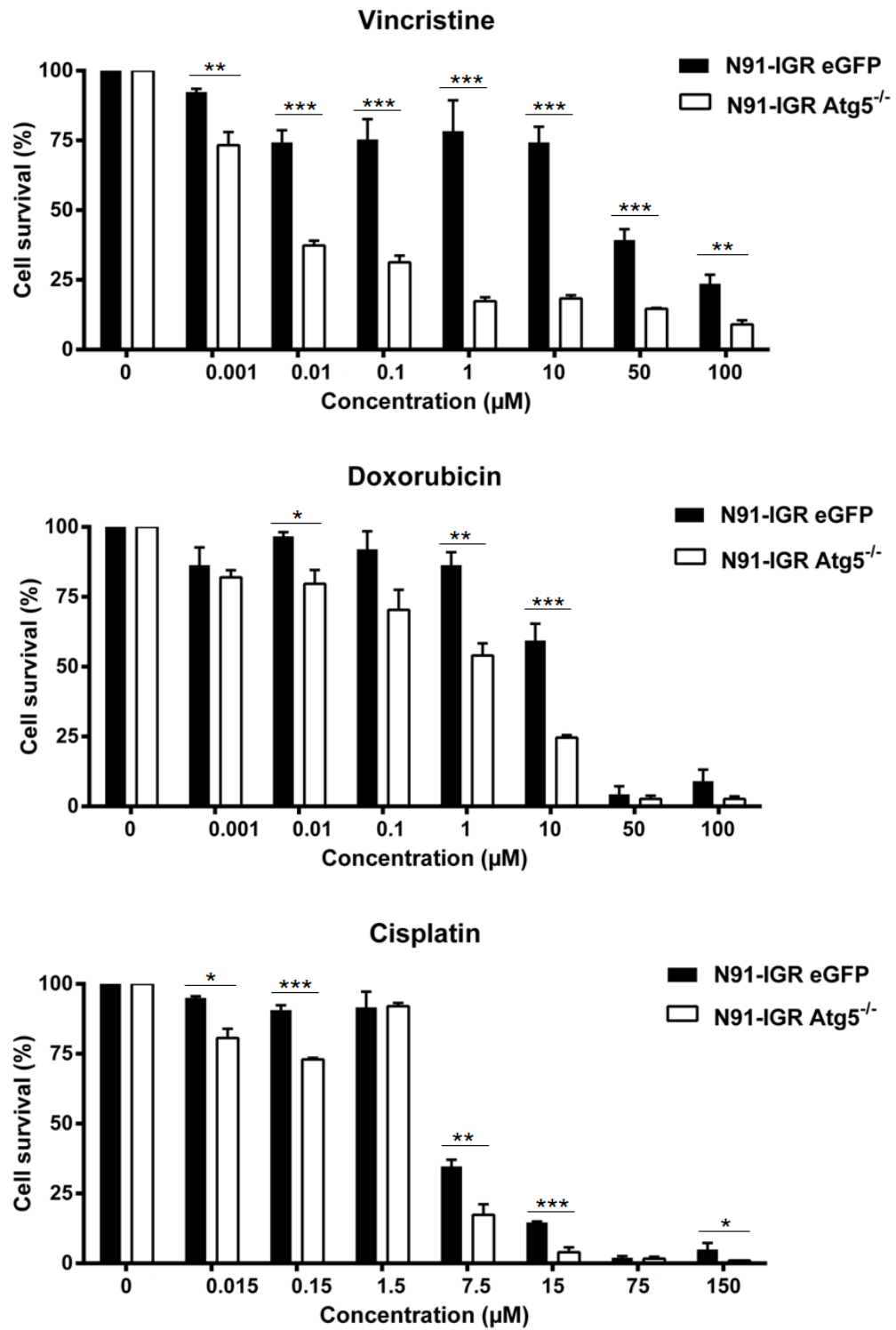
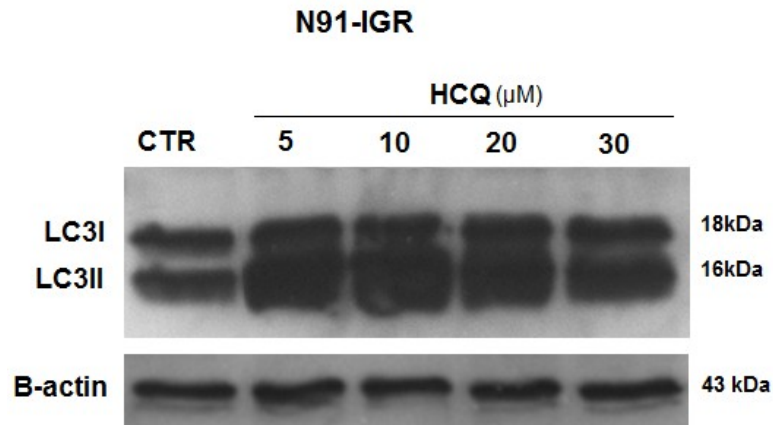


Figure 3 Belounis *et al.*

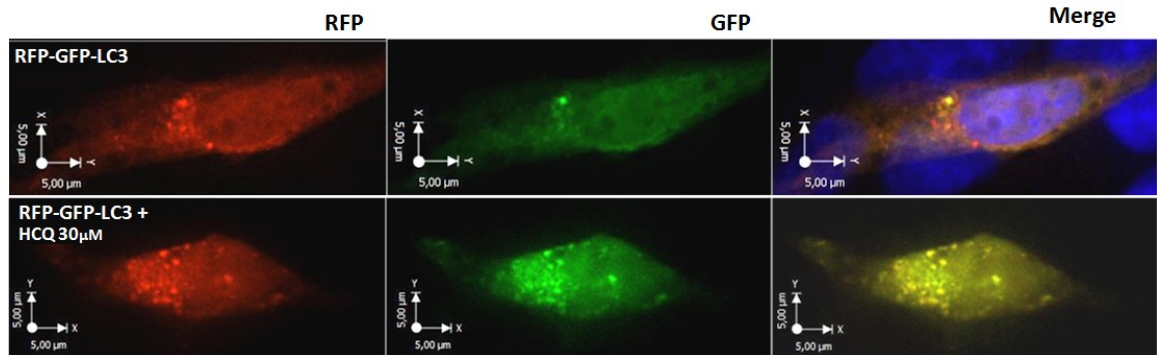
C)

Figure 3 Belounis *et al.*

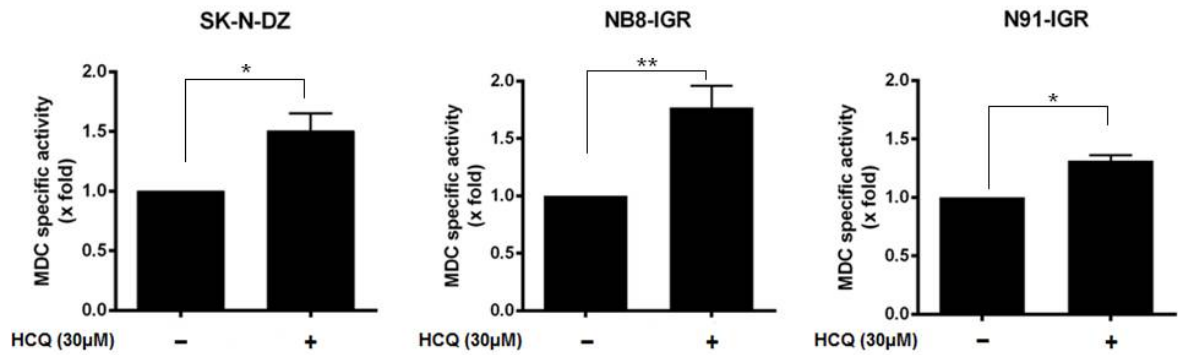
A)



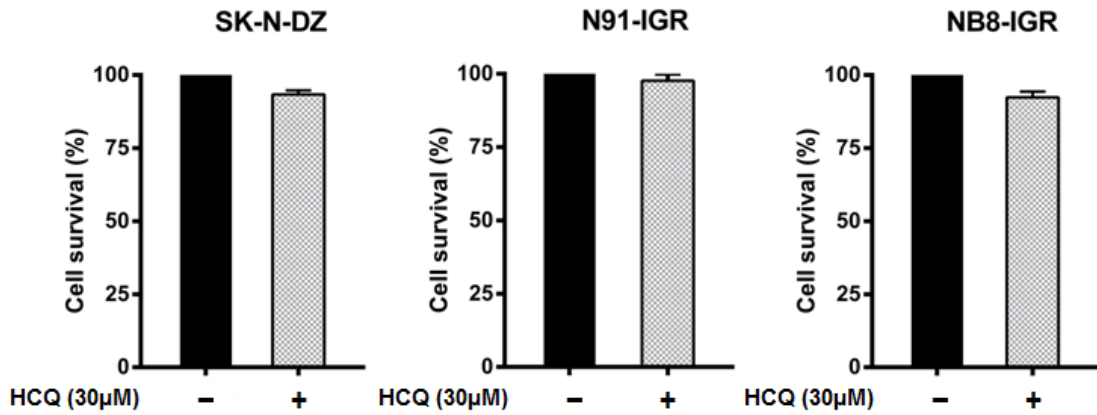
B)



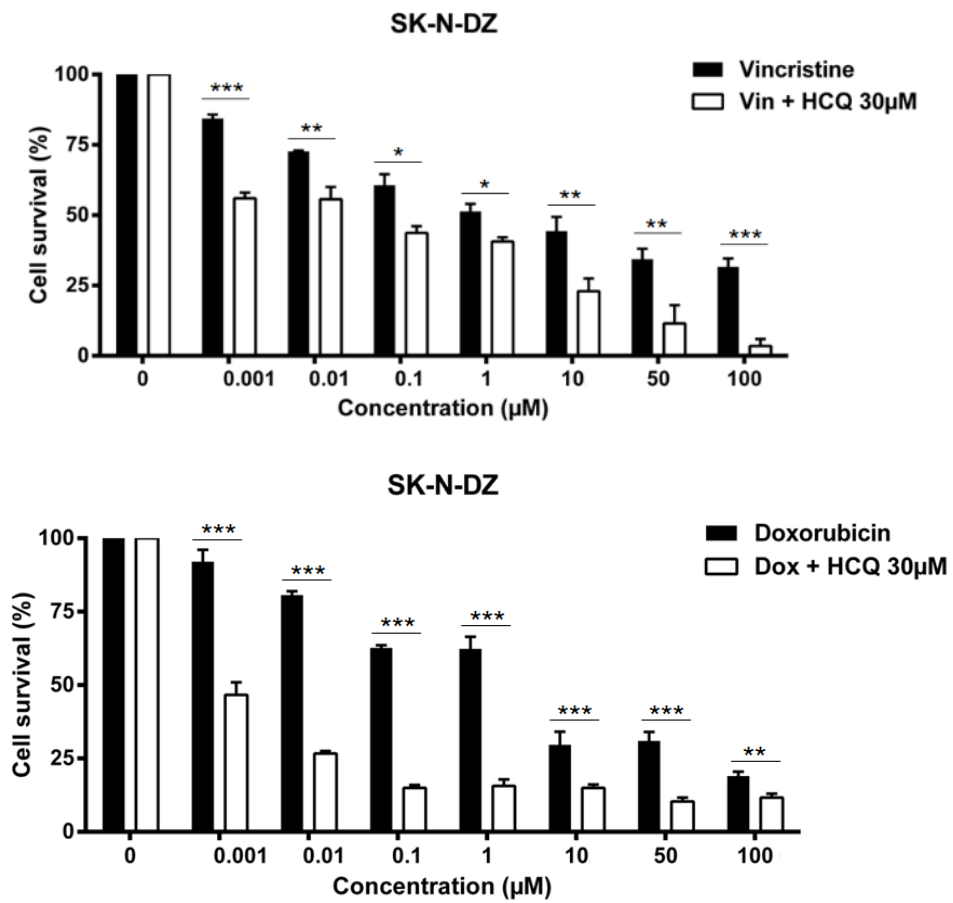
C)

Figure 4 Belounis *et al.*

D)



E)

Figure 4 Belounis *et al.*

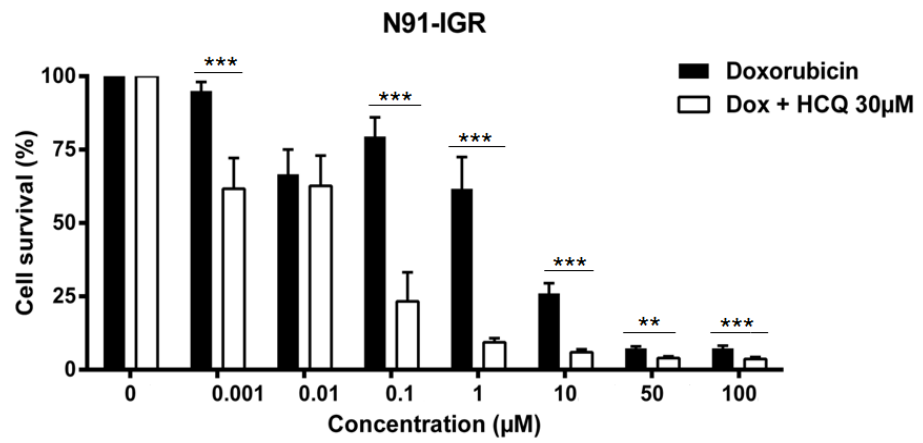
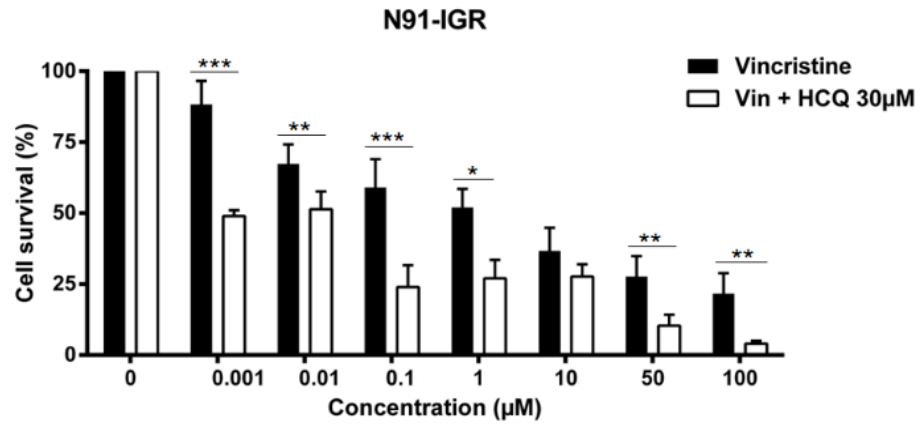
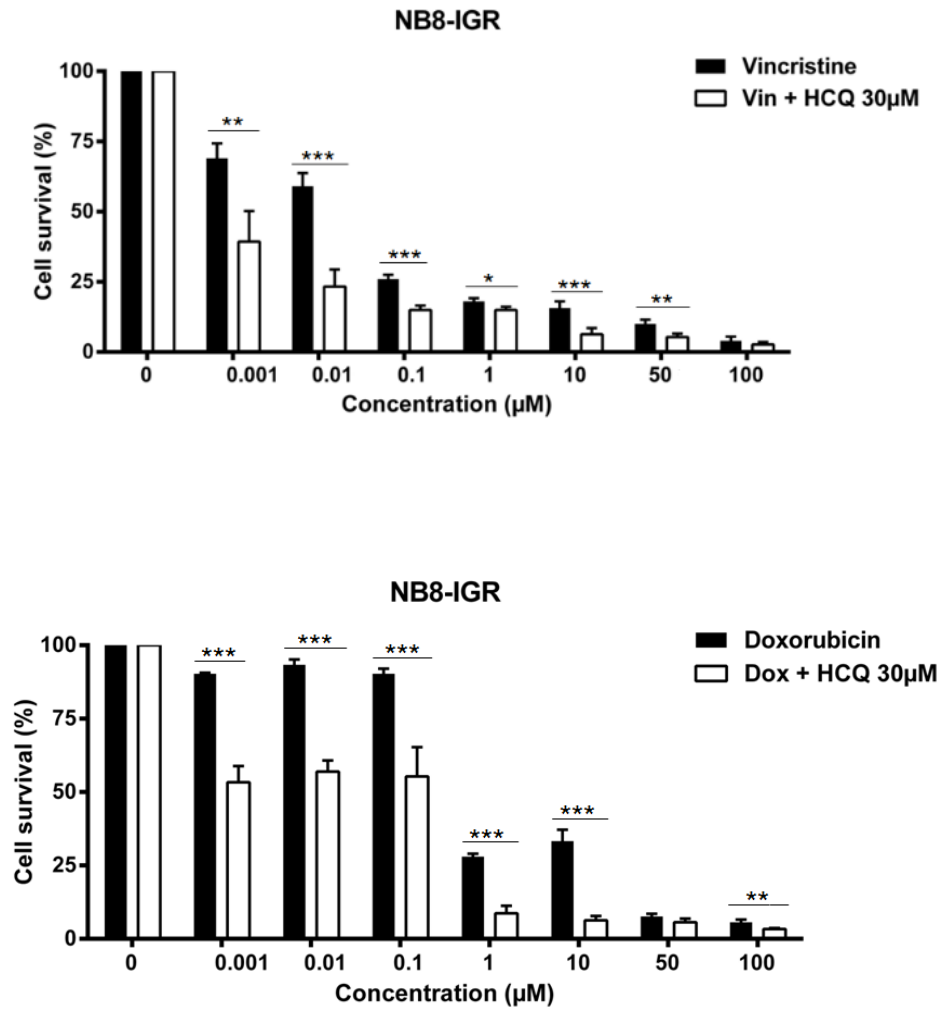


Figure 4 Belounis *et al.*

Figure 4 Belounis *et al.*

F)

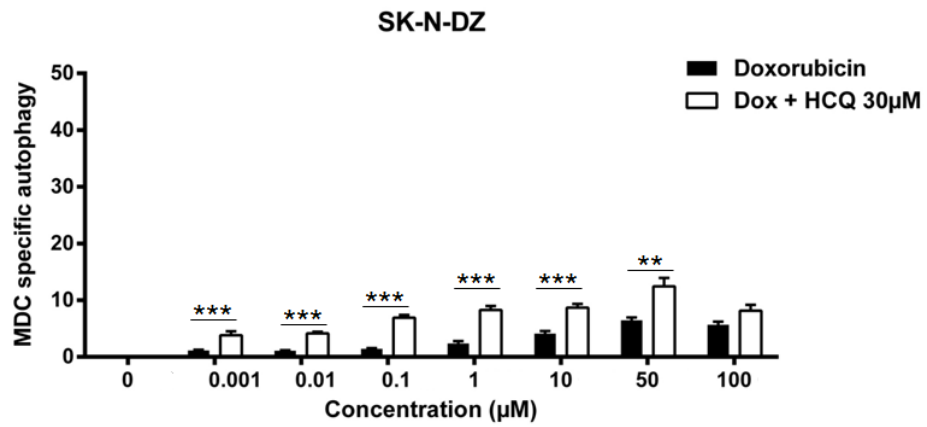
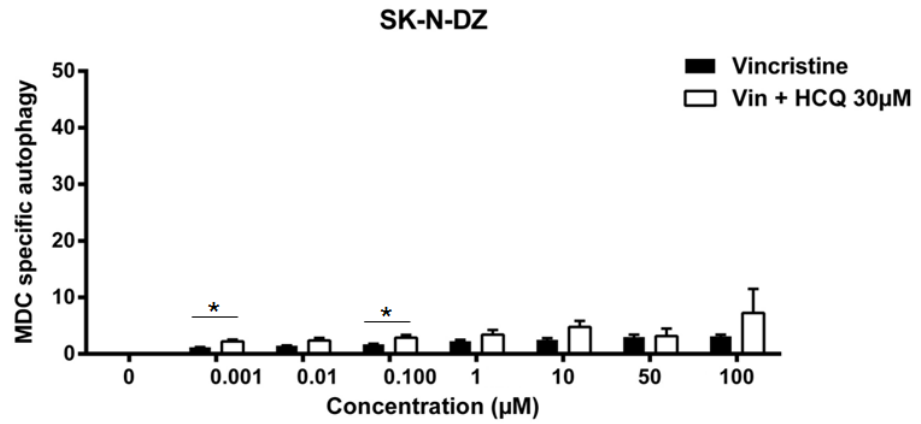


Figure 4 Belounis *et al.*

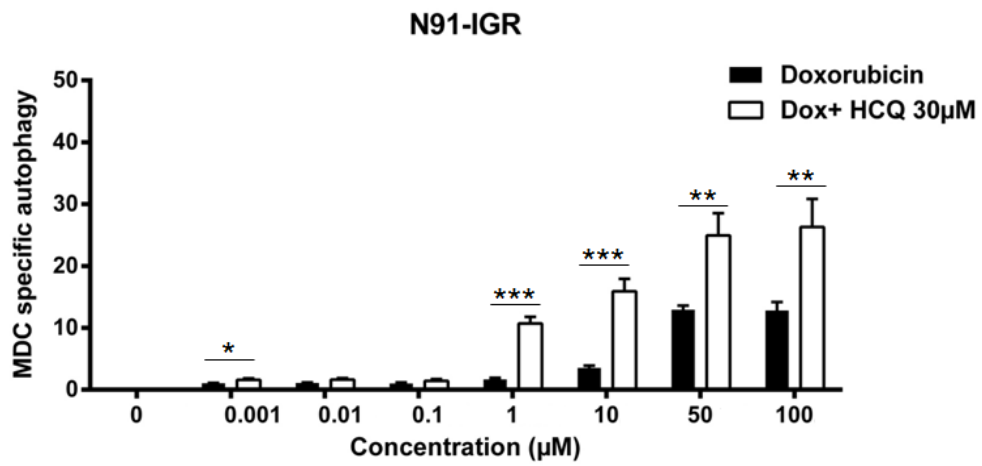
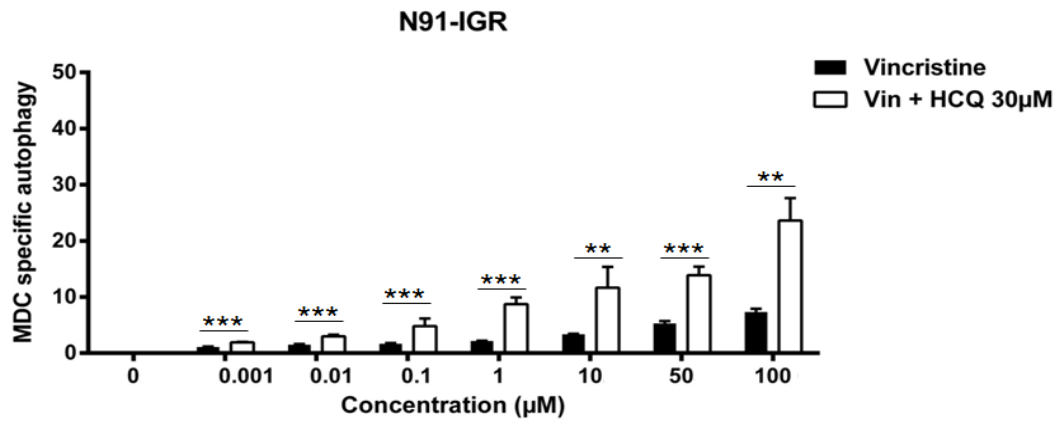


Figure 4 Belounis *et al.*

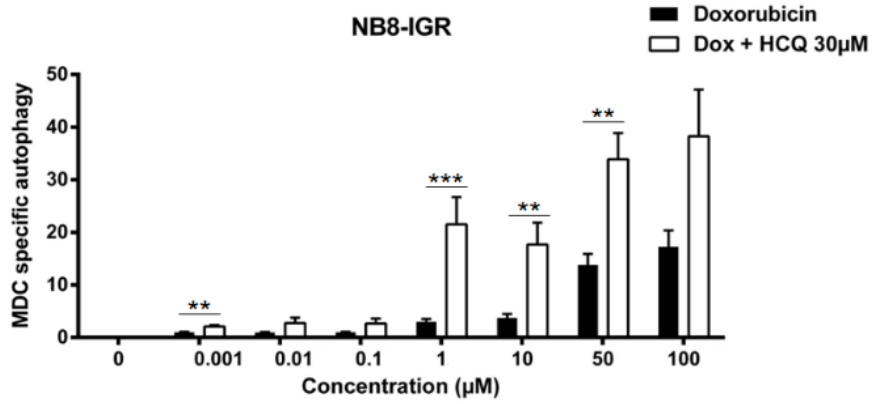
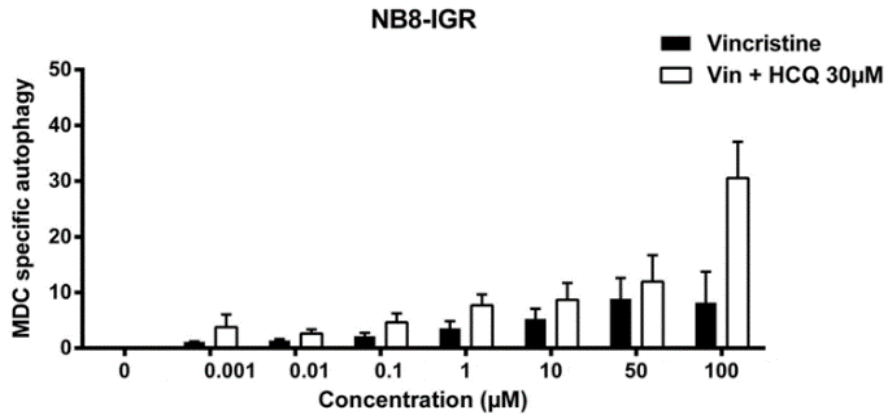
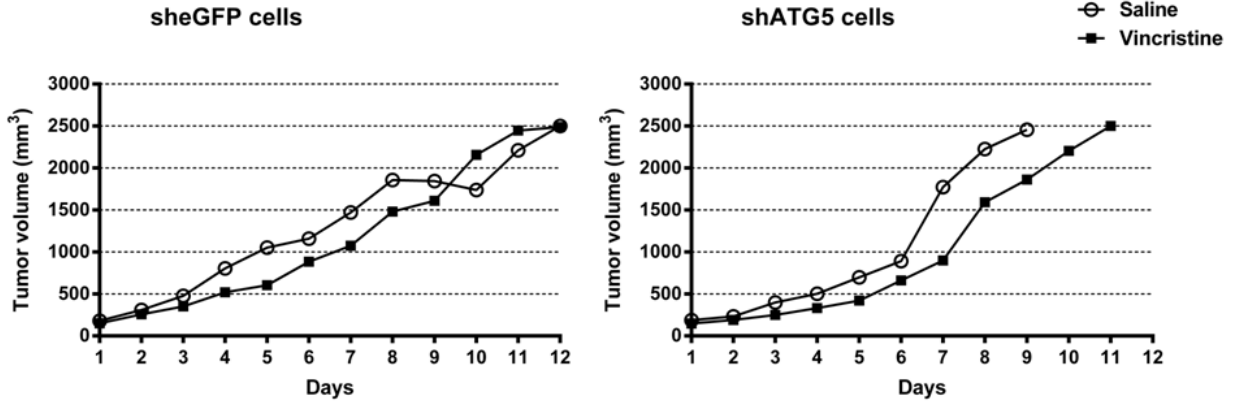


Figure 4 Belounis *et al.*

A)



B)

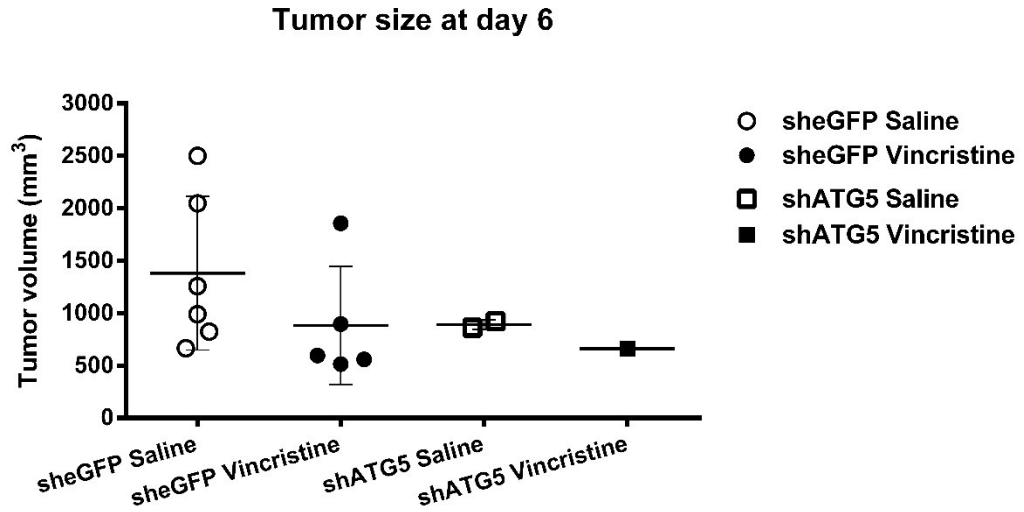


Figure 5 Belounis *et al.*

Chapitre 7: Résultats

7.1 Résultats de l'article p.46 à 93

7.2 L'effet de HCQ sur la progression tumorale *in vivo*

Après avoir étudié *in vivo*, l'inhibition de l'autophagie par blocage d'ATG5, nous avons utilisé dans un deuxième temps un inhibiteur médicamenteux de l'autophagie, l'HCQ. Ainsi nous avons analysé dans un modèle murin, les conséquences d'un traitement par HCQ sur le développement tumoral et sur la réponse à la chimiothérapie.

Cinq millions de cellules N91-IGR ont été injectées en sous-cutanée à des souris NSG. Lorsque les tumeurs atteignaient 200 mm³, les souris recevaient selon le groupe soit du sérum physiologique (contrôle), soit de l'HCQ (60mg/kg/jour), soit de la vincristine (0.4 mg/kg/jour) ou bien une combinaison d'HCQ et vincristine pendant 5 jours consécutifs. La progression tumorale a été suivie soit jusqu'à ce que les tumeurs atteignent une taille limite (2500 mm³) soit 10 jours après la fin du traitement (Figure 9). À jour 6 post-traitement, nous avons noté un effet sur la taille de la tumeur pour le groupe ayant reçu HCQ seule (799 mm³) ainsi que celui ayant reçu de la vincristine seule (976 mm³). Cependant, les souris ayant reçu la combinaison d'HCQ et vincristine ne montrent pas d'effet significatif sur la taille de la tumeur (1036.8 mm³) par rapport au groupe ayant reçu du sérum physiologique (Tableau VIII). Ces résultats très préliminaires sur un nombre limité de souris ne nous a pas permis de tirer de conclusions quant à l'effet de combinaison d'HCQ sur la sensibilisation de la tumeur à la chimiothérapie.

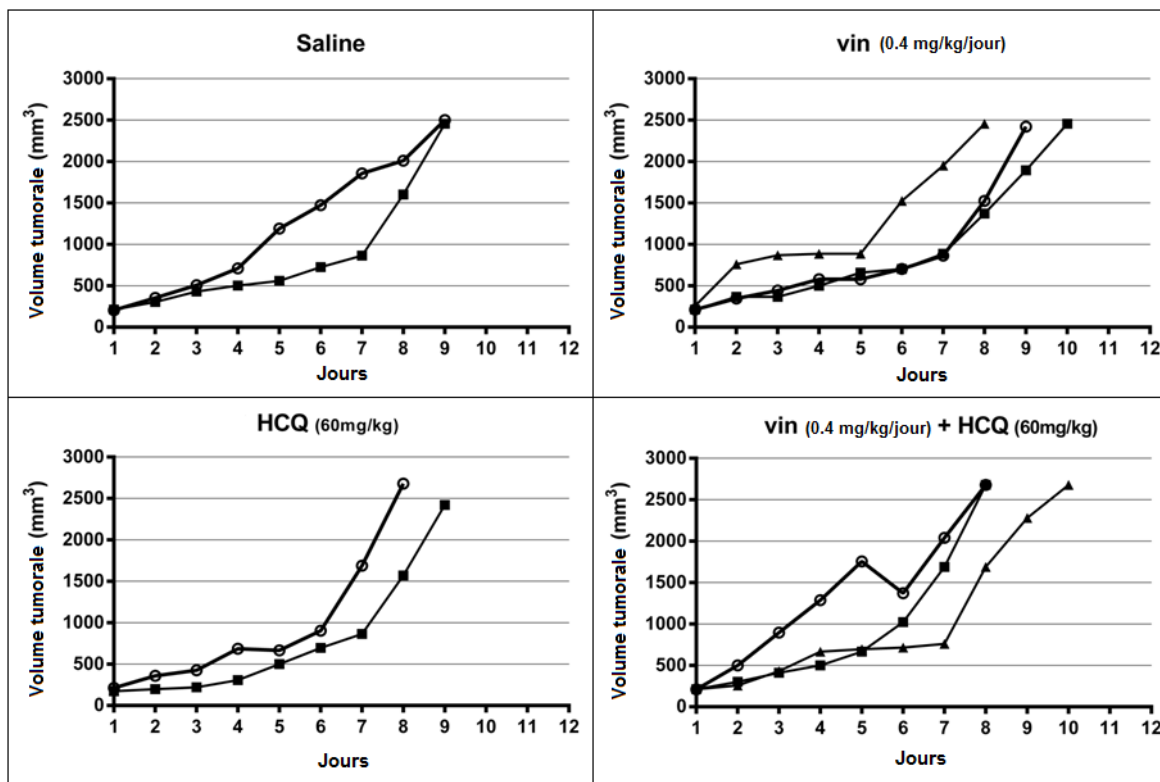


Figure 9 : Effet d'HCQ seule ou en combinaison avec la vincristine sur la progression tumorale *in vivo*.

Les souris NSG ont développé des tumeurs à partir d'injections s.c. de $5 \cdot 10^6$ cellules N91-IGR. Les graphes montrent la progression tumorale dans les différents groupes du jour 1, qui représente l'apparition de la tumeur, jusqu'à ce qu'elle atteigne le point limite (2500 mm^3)

Tableau VIII : Effet d'HCQ sur la sensibilisation de la tumeur à la vincristine *in vivo*

Type de cellules	Nombre de cellules injectées	Traitements	Volume tumorale (mm^3) à jour 6
N91-IGR	$5 \cdot 10^6$	Saline	1098.7 (n=2)
		HCQ (60mg/kg)	799.0 (n=2)
		Vincristine (0.4 mg/kg/jour)	976.0 (n=3)
		Vincristine + HCQ	1036.8 (n=3)

7.3 Évaluation du niveau d'autophagie dans les cellules souches du NB.

Dans une étape préliminaire d'investigation des causes de chimiorésistance, nous nous sommes intéressés à l'implication de l'autophagie dans les CSCs du NB. En effet, les CSCs sont dotées de propriétés d'auto-renouvellement et de quiescence qui leur permettent d'être naturellement résistantes à la chimiothérapie. Dans ce contexte, nous avons effectué une sélection par cytométrie de flux de CSCs du NB grâce au marqueur CD133. Les cellules souches (exprimant CD133) ont été comparées aux cellules non-souches (n'exprimant pas CD133). Les résultats de Western-blot (Figure 10) montrent un ratio LC3II/LC3I plus élevé dans les cellules souches que dans les cellules non-souches dans les lignées SK-N-DZ et NB8-IGR témoignant ainsi d'une activité autophagique accrue dans les CSCs.

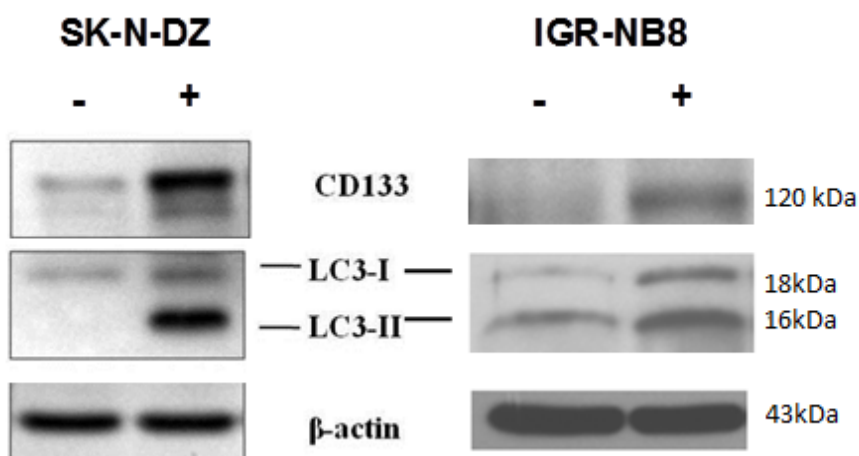


Figure 10 : Niveau d'expression de LC3II dans les CSCs du NB.

Les cellules des deux lignées cellulaires de NB ont été triées par cytométrie de flux utilisant l'un anticorps CD133. Les lysats des cellules ont été analysés par Western-blot afin de mesurer les niveaux protéiques de CD133, de LC3I, de LC3II et de β -actine.

Discussion

Le NB est une tumeur très hétérogène avec une évolution clinique très variable allant d'une régression spontanée à une évolution défavorable caractérisée par la présence de métastases.²³ Pour les NB à haut risque, malgré une thérapie très lourde et agressive comportant la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie ainsi que l'immunothérapie, l'évolution est souvent défavorable, d'où une nécessité urgente à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à améliorer les traitements, et ainsi guérir les enfants atteints de NB.

L'une des problématiques majeures rencontrées dans le traitement du NB agressif, et/ou récidivant est **la chimiorésistance**. L'autophagie est un mécanisme d'auto-dégradation des constituants cellulaires endommagés dans le but de synthétiser de nouvelles protéines et organites ou bien de fournir de l'énergie. Plusieurs études ont rapporté que l'autophagie participe à la chimiorésistance dans certains cancers. Cependant, le rôle de l'autophagie dans le cancer reste jusqu'à ce jour très controversé. Alors que certains résultats expérimentaux démontrent que l'inhibition de l'autophagie augmente la chimiosensibilité, d'autres études stipulent plutôt une implication de l'autophagie dans la mort des cellules tumorales.

En effet, Jiang et *al.* ont démontré que l'utilisation d'un nouvel inhibiteur de protéasome activant l'autophagie induisait la mort cellulaire dans le cancer de la prostate.¹⁶⁸ De plus, Bursch et *al.* ont aussi démontré que le tamoxifen induisait l'autophagie et la mort cellulaire dans le cancer du sein.¹⁰⁸ Quant aux inhibiteurs des histones déacétylases comme le vorinostat, ils induisent une mort cellulaire autophagique dans les cellules HeLa qui surexpriment la protéine anti-apoptotique BCL-XL.¹⁶⁹

Par contre, d'autres études ont démontré l'implication de l'autophagie dans la tumorigenèse en raison du rôle crucial de l'autophagie dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. De plus, plusieurs études ont démontré une augmentation de l'autophagie après des traitements chimiothérapeutiques.^{126,127} Les cellules cancéreuses utiliseraient donc l'autophagie pour

échapper au stress et la toxicité engendrée par la chimiothérapie ce qui les rendrait plus résistantes.¹¹⁷

Le premier but de notre étude a été de déterminer si l'autophagie était présente dans les cellules de NB et si elle représentait un facteur pronostic pour les patients atteints de NB.

Notre étude immunohistochimique montre que l'autophagie est présente dans le NB puisque le LC3II, un marqueur spécifique de l'autophagie, est présent dans 80% des tumeurs mais à un niveau d'intensité assez bas (intensité moyenne 0.83). Ceci est en accord avec la littérature qui stipule que l'autophagie est présente dans les cellules tumorales à un niveau basal.⁷⁰ Cependant, certaines études comme celles menées par Yang et *al.* montrent une augmentation de l'autophagie dans les cellules du cancer du pancréas et que ces cellules ont besoin de l'autophagie pour maintenir leur croissance.¹²³

Dans notre étude, l'autophagie ne semble pas être un facteur pronostic dans le NB car il n'y avait pas de relation apparente entre l'expression de LC3II et les facteurs pronostiques cliniques comme le stade clinique. Par contre, on a noté une différence significative entre l'expression de LC3II dans les tumeurs de stade 4 (intensité moyenne 1,12) et les tumeurs de stade 4S (intensité moyenne 0,34). Si le niveau d'autophagie est bas dans les stades 4S, l'apoptose est quant à elle élevée puisque nous avons une forte expression de la caspase 3 ainsi qu'un taux élevé de cellules positives au TUNEL dans les tumeurs 4S. Ceci est parfaitement en accord avec les propriétés des tumeurs 4S qui régressent spontanément et suggère une destruction importante des cellules par apoptose. Dans d'autres tumeurs, l'autophagie est un facteur pronostique. Ainsi, il a été rapporté dans une étude récente de Ma et *al.* que l'autophagie prédit la chimiorésistance ainsi que la survie dans le mélanome.¹⁷⁰ Chen et *al.* ont démontré également que l'expression de LC3 est un facteur pronostique de la survie dans le cancer de l'œsophage traité avec une combinaison de chimiothérapie et de radiothérapie.¹⁷¹ À l'inverse de LC3II, nous montrons que Beclin 1 est un facteur de mauvais pronostic dans le NB. En effet, l'expression de Beclin 1 est plus élevée dans les tumeurs standards par rapport aux tumeurs diagnostiquées par dépistage systématique.

Le deuxième objectif de notre étude a été d'évaluer la contribution de l'autophagie dans la résistance du NB traité par chimiothérapie. Dans un premier temps, nous avons évalué si le traitement par chimiothérapie induisait l'autophagie dans les cellules de NB. Pour cela, nous avons utilisé des médicaments en monothérapie à doses croissantes. Les trois premiers testés ont été la vincristine, la doxorubicine et la cisplatine qui sont des agents de chimiothérapie très utilisés en clinique dans le traitement du NB.

La vincristine, un alcaloïde qui se fixe sur les dimères de tubuline libre empêchant la polymérisation des microtubules, ainsi que la doxorubicine, un agent chimiothérapeutique génotoxique qui produit des radicaux hydroxyles réactifs entraînent une augmentation d'autophagie. Ceci n'est pas surprenant puisque les radicaux libres sont également des inducteurs d'autophagie. Ceci a été également démontré dans le cancer de la thyroïde où la doxorubicine entraîne une augmentation de la formation d'autophagosomes.¹⁷² Notre étude démontre que le traitement par la vincristine ou la doxorubicine entraîne une augmentation de l'autophagie de façon dose dépendante pour la vincristine mais pas pour la doxorubicine.

La cisplatine est un complexe à base de platine qui se fixe directement sur l'ADN entraînant une variation de la conformation du double brin d'ADN et empêchant ainsi la réplication. Dans le cancer de l'œsophage, une étude a démontré que la cisplatine est un inducteur d'autophagie.¹³⁰ En accord avec ces données, nous avons démontré que la cisplatine entraîne à des concentrations croissantes une augmentation de l'autophagie dans les cellules du NB.

Nous avons aussi démontré dans notre étude *in vitro* que le temozolomide, un agent alkylant de l'ADN, induit la formation des autophagosomes alors que la survie cellulaire n'est que légèrement affectée. En effet, le clivage de LC3I en LC3II témoigne d'une activation de l'autophagie. Les résultats dans cette étude montrent également que LY294002, un inhibiteur de PI3K, induit l'autophagie dans les cellules de NB; en effet, nous avons observé une augmentation du clivage de LC3I en LC3II, proportionnelle à la dose de LY294002. En accord avec ce résultat, des données de la littérature rapportent que ce médicament est un inducteur d'autophagie.¹⁷³

La rapamycine, connue pour son rôle inhibiteur de la voie mTOR est un activateur puissant de l'autophagie. L'utilisation de ce médicament dans nos quatre lignées cellulaires confirme son pouvoir d'induction de l'autophagie. Cette observation est liée à son rôle dans l'inhibition de la protéine mTOR. Cependant, il a été montré que ce médicament déclenche également de nombreuses phosphorylations qui activent la transcription des gènes ATG8 et ATG14 impliqués dans l'autophagie.¹⁷⁴

Les lignées cellulaires de NB que nous avons étudiées expriment des caractères biologiques différents qui peuvent générer des résultats divergents. En effet les lignées SK-N-DZ et NB-10 sont caractérisées par l'amplification du gène *MYCN* ce qui leur confère une plus grande agressivité à l'inverse des cellules SK-N-SH et SK-N-FI. Alors que Tsuneoka et *al.* ont montré qu'une surexpression de *CMYC* induisait fortement l'autophagie dans les fibroblastes de rats 3Y1¹⁷⁵, nos résultats ont indiqué que les lignées cellulaires de NB avec amplification du gène *MYCN* ne présentaient pas une augmentation de l'autophagie en comparaison avec les autres lignées cellulaires.

Afin de valider nos études *in vitro*, nous avons réalisé des expérimentations *in vivo*. En effet, l'étude immunohistochimique réalisée sur des tumeurs développées dans des souris xénotransplantées avec des cellules SK-N-DZ a révélé une nette positivité de LC3II après traitement à la cisplatine par rapport au groupe non-traité traduisant ainsi une augmentation de l'autophagie dans les tumeurs en réponse au traitement au cisplatine. Ceci a également été observé dans les tumeurs développées à partir d'injections de cellules NB-10 et traité avec du témozolomide.

L'activation de l'autophagie en réponse à un traitement chimiothérapeutique est un phénomène très observé dans différents cancers utilisant différents médicaments¹²⁶. Cette observation a incité de nombreuses études et essais cliniques à vouloir interférer avec ce mécanisme afin de sensibiliser les cellules tumorales aux différents traitements préconisés.^{126,170,176} En effet, plusieurs études ont utilisé une variété d'inhibiteurs d'autophagie en combinaison avec des traitements de chimiothérapie, dans le traitement de cancers. Ces inhibiteurs sont le plus souvent des agents chimiques qui vont agir, soit à une étape précoce

de l'autophagie comme la 3-méthyladénine ou la wortmanine, ou à une étape tardive comme la chloroquine et son analogue l'hydroxychloroquine.

Le troisième objectif de ce projet a été de démontrer l'intérêt de l'inhibition de l'autophagie associée à la chimiothérapie et le rôle de l'autophagie dans la chimiorésistance du NB.

Nous avons utilisé deux formes d'inhibition de l'autophagie afin d'investiguer la sensibilisation à la chimiothérapie induite par l'inhibition de l'autophagie dans les cellules de NB. Nous avons, dans un premier temps, procédé à une inhibition de l'autophagie précoce en inactivant le gène *ATG5* (knockdown) par infection des cellules de NB avec un lentivirus contenant un ARN interférant spécifique (shRNA: *short hairpin RNA*). Il est établi qu'*ATG5* est nécessaire à l'initiation de l'autophagie en formant un complexe avec *ATG12*. On utilise communément l'inactivation du gène *ATG5*, *ATG7*, *ATG12* ou *Beclin 1* afin d'inhiber l'autophagie. Une fois ce complexe bloqué, la formation d'autophagosomes ne peut avoir lieu et par conséquent le mécanisme d'autophagie échoue. Dans notre projet, l'utilisation d'un shRNA dirigé contre *ATG5* montre un blocage de l'autophagie mis en évidence par des immunobuvardages montrant des expressions réduites voire absentes d'*ATG5* et de LC3II. Ceci a été confirmé par le test MDC montrant qu'un traitement avec des concentrations croissantes de vincristine n'induisait pas d'autophagie dans les cellules dont le gène *ATG5* a été invalidé.

Des travaux réalisés par Ma et *al.* montrent que le knockdown d'*ATG5* ou d'*ATG7* induisait une mort cellulaire dans le mélanome.¹⁷⁰ De plus Yang et *al.* ont également rapporté une mort cellulaire du carcinome pancréatique.¹²³ Au contraire, nos résultats démontrent que l'inhibition de l'autophagie en utilisant un shRNA contre *ATG5* n'entraînait pas une mortalité dans les cellules du NB ce qui montre la possibilité que certaines cellules utilisent l'autophagie pour assurer leur survie. En revanche, les cellules dont *ATG5* a été invalidé montrent une sensibilité accrue aux traitements chimiothérapeutiques (vincristine, doxorubicine ou cisplatine) par rapport aux cellules contrôles. L'effet de l'inhibition de

l'autophagie est plus marqué pour la vincristine, où une différence très significative de sensibilité à chaque point la courbe dose-réponse du médicament est observée. Alors que notre étude démontre une augmentation de la chimiosensibilité des cellules de NB dont le gène *ATG5* a été invalidé, une autre étude suggère plutôt que l'invalidation du gène *ATG12* ne sensibilise pas les cellules au traitement à la rapamycine ou au LY294002.¹⁷⁷

En utilisant ces cellules dont le gène *ATG5* a été invalidé, nous avons voulu déterminer la capacité de ces cellules à développer des tumeurs *in vivo* ainsi qu'évaluer leur réponse à la chimiothérapie. Pour ce faire, nous avons utilisé des souris NSG qui ont reçu une injection sous-cutanée de cellules *ATG5*^{kd} et des cellules contrôles ayant été transduites avec un vecteur vide. Nos résultats ont démontré l'importance de l'autophagie dans la formation de tumeurs ainsi que la survie tumorale à la suite du traitement. En effet, les souris ayant été injectées avec des cellules dont le gène *ATG5* a été invalidé développent significativement moins de tumeurs et sont plus sensibles au traitement en comparaison avec les cellules contrôles.

CQ ou HCQ sont des agents pharmacologiques largement utilisés dans le traitement de la malaria, l'arthrite rhumatoïde ou encore lupus érythémateux disséminé.¹⁷⁸ CQ et son analogue HCQ sont également très connus pour leur propriété inhibitrice de l'autophagie. En effet, ils inhibent l'autophagie en empêchant la fusion des autophagosomes avec les lysosomes en agissant sur le pH de ces derniers. Dans un milieu non acide, les protéases lysosomales sont inactives ce qui empêche la dégradation des constituants cellulaires. Dans notre étude nous avons spécifiquement utilisé HCQ en raison de sa plus faible toxicité.

Nous avons voulu vérifier lors de cette étude si HCQ bloquait bien l'autophagie dans les cellules du NB. On a utilisé trois différentes méthodes afin de s'assurer de l'effet d'HCQ. Le test de mesure d'autophagie, MDC, un immunobuvardage pour évaluer les différents niveaux d'expression des protéines impliquées dans l'autophagie ainsi qu'un marquage spécifique des autophagosomes avec un tandem fluorescent (RFP-GFP-LC3 transfecté dans les cellules) qui est analysé par microscopie confocale. Les résultats démontrent une

accumulation d'autophagosomes en réponse à l'HCQ, témoignant d'un blocage de l'autophagie à un stade tardif dans les cellules de NB. Par ailleurs, nous n'avons pas mis en évidence un effet significatif d'HCQ sur la viabilité cellulaire des lignées de NB (SK-N-DZ, N91-IGR et NB8-IGR). Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature montrant qu'HCQ seule n'induit pas la mort des cellules de mélanome.¹⁷⁹ Cependant, dans d'autres types de cancer, il a été montré que l'HCQ induit une mort cellulaire.¹⁸⁰ Certains essais cliniques ont évalué l'efficacité de l'HCQ seule sans combinaison avec d'autres médicaments dans le traitement du cancer du pancréas, du cancer du sein, du carcinome rénal ainsi que la LLC^{181,143}, ce qui indique qu'HCQ peut, à elle seule, présenter des propriétés anti-tumorales dans certains types de cancers.

Ensuite, nous avons voulu investiguer si l'inhibition de l'autophagie par HCQ permettrait de potentialiser l'effet de la chimiothérapie contre les cellules du NB. Nos tests de viabilité cellulaire montrent une sensibilisation significative des cellules SK-N-DZ, N91-IGR et NB8-IGR à la combinaison HCQ et vincristine ou doxorubicine en comparaison avec les cellules ayant été traitées avec vincristine ou doxorubicine seule. Ceci suggère un rôle cytoprotecteur de l'autophagie contre la thérapie anticancéreuse. Ces résultats obtenus à partir de cultures de NB sont parfaitement en accord avec de multiples expérimentations *in vitro* et *in vivo* montrant l'effet de l'inhibition de l'autophagie dans la sensibilisation des cellules tumorales à la chimiothérapie¹⁸², l'entrée en apoptose¹⁸³ ainsi que la diminution de la toxicité de la thérapie combinée.¹⁸⁴ C'est le cas notamment d'études menées par Kanzawa et *al.* dans les cellules de gliome.¹⁸⁵ Liang et *al.* ont démontré que l'utilisation de la CQ en combinaison avec une immunothérapie à base d'IL2 dans le mélanome et le carcinome rénal une augmentation significative de la survie des patients à long terme.¹⁸⁴ Quadir et *al.* ont aussi montré qu'une inhibition de l'autophagie sensibilise les cellules résistantes au tamoxifène dans le cancer du sein.¹⁷⁶ De plus, de nombreux essais cliniques sont en cours pour tester l'efficacité de l'HCQ et de la CQ, ainsi que d'autres inhibiteurs d'autophagie dans le traitement de tumeurs solides. Par exemple, la combinaison de la CQ avec de la chimiothérapie conventionnelle a grandement amélioré la survie des patients atteints de glioblastome.¹⁸⁶

Notre étude *in vivo* mettant en évidence l'effet de l'HCQ sur la progression tumorale et la chimiosensibilité des tumeurs n'a, cependant, pas permis de corroborer nos résultats obtenus *in vitro*. En effet, nous avons montré que l'HCQ induit une diminution de la taille de la tumeur au 6^{ème} jour du traitement en comparaison avec le groupe contrôle ayant reçu uniquement de la solution saline. Le traitement à la vincristine a également induit une diminution de la tumeur. Cependant la combinaison HCQ et vincristine ne semble pas avoir un effet supérieur à celui de la vincristine seule. Ces résultats sont encore préliminaires et ont été réalisés sur faible nombre de souris. En revanche, des données de la littérature montrent l'effet de sensibilisation d'HCQ en combinaison avec différentes chimiothérapies sur la progression tumorale dans de multiples types de tumeurs. C'est le cas d'une étude réalisée par Carew et *al.* où il a été mis en évidence une diminution significative de la taille de la tumeur xénotransplantée après traitement à la CQ et vorinostat dans le cancer du côlon.¹³⁷ Dans le carcinome hépatocellulaire, des données indiquent une diminution significative de la taille tumorale après traitement de la CQ combiné à l'oxaliplatine.¹⁸⁷

Ainsi, notre étude *in vitro* démontre que l'utilisation d'un inhibiteur d'autophagie en combinaison avec une chimiothérapie conventionnelle dans le traitement du NB pourrait améliorer les traitements préconisés aux enfants atteints de NB. Elle devra cependant être complétée par une étude *in vivo* de grande envergure. Si les résultats de cette étude *in vivo* s'avèrent significatifs, elle encouragera fortement la réalisation d'essais cliniques de phase I/II utilisant l'HCQ comme adjuvant à la thérapie anticancéreuse contre le NB.

Dans notre étude des facteurs impliqués dans la chimiorésistance du NB, nous nous sommes également intéressés aux CSCs. En effet, leurs propriétés leur permettent de résister à la chimiothérapie ainsi qu'à la radiothérapie.^{157,188}

Dans une étude préliminaire, la population de cellules souche, enrichie en cellules CD133+, des lignées SK-N-DZ et NB8-IGR montrent une augmentation du niveau de LC3II ce qui témoigne d'une autophagie activée. Ce résultat très intéressant montre que les

CSCs de NB résistantes à la chimiothérapie présentent également une autophagie active possiblement. Ce niveau d'autophagie élevé pourrait participer au caractère agressif et à la résistance à la chimiothérapie des CSCs de NB. Plusieurs études ont démontré la contribution de l'autophagie dans la chimiorésistance des CSCs dans plusieurs cancers ¹⁸⁹ ainsi que le maintien des CSCs. ¹⁹⁰ Néanmoins, les mécanismes par lesquels l'autophagie contribue à la chimiorésistance des CSCs exigent plus d'investigations.

Conclusion

Caractérisé par une grande hétérogénéité tumorale, le NB représente un cancer pédiatrique d'évolution clinique très variable allant d'une régression spontanée à une évolution très agressive de la tumeur. Malgré des thérapies multimodales très lourdes, 40% des enfants succombent à la maladie. Il existe, par conséquent, un besoin impératif développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à guérir ces enfants. Au cours des dernières décennies plusieurs hypothèses concernant les causes de l'échec des traitements conventionnels ont été émises, dont celle de la chimiorésistance des CSCs. La chimiorésistance représente une problématique majeure dans le traitement du NB.

Dans ce mémoire, il a été question d'explorer l'autophagie et de déterminer le rôle de cette dernière dans la chimiorésistance du NB. Nos résultats ont démontré la présence de l'autophagie à un niveau basal dans le NB et que l'expression de Beclin 1 est un facteur de mauvais pronostic pour les enfants atteints de NB. Par ailleurs, la chimiothérapie conventionnelle du NB induit une augmentation de l'autophagie *in vitro* et *in vivo* dans les lignées de NB. L'inhibition de l'autophagie au niveau génétique ou en utilisant un agent pharmacologique, HCQ, sensibilise significativement les cellules du NB à la chimiothérapie *in vitro*.

Par conséquent, il serait très intéressant d'utiliser des inhibiteurs de l'autophagie en combinaison avec la chimiothérapie pour améliorer les traitements du NB. Notre étude servira de base pour la mise au point d'études cliniques visant à offrir une meilleure chance de survie aux enfants atteints de NB.

Perspectives

Notre projet de recherche a mis en évidence l'importance de l'autophagie en tant que mécanisme cytoprotecteur dans la chimiorésistance du NB. Des études *in vitro* et *in vivo* utilisant différentes techniques ont de mieux comprendre la biologie du NB. Cependant d'autres expérimentations seraient très importantes à réaliser. En effet, compléter l'étude *in vivo* montrant l'effet d'HCQ dans la chimiosensibilité des tumeurs xénogreffées à la chimiothérapie serait impératif. L'HCQ est un agent chimique communément utilisé dans le traitement de différentes pathologies. De ce fait, c'est un médicament, qui peut être du point de vue pratique, être facilement introduit dans une thérapie anticancéreuse. Il serait par conséquent très intéressant de proposer l'HCQ comme adjuvant à une chimiothérapie contre le NB.

Dans l'optique de l'étude des facteurs de chimiorésistance dans le NB, plusieurs investigations supplémentaires seraient très intéressantes à réaliser concernant les CSCs du NB. Il serait important d'étudier les propriétés qui confèrent aux CSCs leur caractère agressif. L'étude de l'autophagie, sa modulation ainsi que son rôle dans les CSCs du NB serait d'un grand intérêt.

Dans le cadre d'un projet à venir de doctorat, mon projet de recherche s'intéressera à une autre problématique rencontrée durant le traitement du NB. En effet, comme la chimiorésistance, la résistance à la radiothérapie joue un rôle important dans l'échec du traitement et les rechutes du NB à haut risque. Nous allons explorer les relations entre l'autophagie et la radiorésistance et évaluer l'intérêt de combiner les inhibiteurs de l'autophagie avec la radiothérapie ciblée dans le traitement des NB réfractaires aux traitements conventionnels. De plus, nous approfondirons nos connaissances dans les voies de signalisation impliquées dans l'induction de l'autophagie en réponse à la radiation.

Bibliographies

1. Maris, J.M. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* **362**, 2202-11 (2010).
2. Davidoff, A.M. Neuroblastoma. *Semin Pediatr Surg* **21**, 2-14 (2012).
3. Park, J.R. *et al.* Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* **60**, 985-93 (2013).
4. Zage, P.E., Louis, C.U. & Cohn, S.L. New aspects of neuroblastoma treatment: ASPHO 2011 symposium review. *Pediatr Blood Cancer* **58**, 1099-105 (2012).
5. Sridhar, S., Al-Moallem, B., Kamal, H., Terrile, M. & Stallings, R.L. New insights into the genetics of neuroblastoma. *Mol Diagn Ther* **17**, 63-9 (2013).
6. Yu, A.L. *et al.* Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med* **363**, 1324-34 (2010).
7. Minoux, M. & Rijli, F.M. Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development* **137**, 2605-21 (2010).
8. Morales, A.V., Barbas, J.A. & Nieto, M.A. How to become neural crest: from segregation to delamination. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 655-62 (2005).
9. Gammill, L.S. & Bronner-Fraser, M. Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci* **4**, 795-805 (2003).
10. Joseph, N.M. *et al.* Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development* **131**, 5599-612 (2004).
11. Motohashi, T. *et al.* Neural crest cells retain their capability for multipotential differentiation even after lineage-restricted stages. *Dev Dyn* (2011).
12. Gershon, T.R., Oppenheimer, O., Chin, S.S. & Gerald, W.L. Temporally regulated neural crest transcription factors distinguish neuroectodermal tumors of varying malignancy and differentiation. *Neoplasia* **7**, 575-84 (2005).
13. Ellison, L.F., De, P., Mery, L.S., Grundy, P.E. & Statistics, C.C.S.s.S.C.f.C.C. Canadian cancer statistics at a glance: cancer in children. *CMAJ* **180**, 422-4 (2009).
14. Heck, J.E., Ritz, B., Hung, R.J., Hashibe, M. & Boffetta, P. The epidemiology of neuroblastoma: a review. *Paediatr Perinat Epidemiol* **23**, 125-43 (2009).

15. Martinsson, T., Sjöberg, R.M., Hedborg, F. & Kogner, P. Homozygous deletion of the neurofibromatosis-1 gene in the tumor of a patient with neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* **95**, 183-9 (1997).
16. Miller, R.W. & Rubinstein, J.H. Tumors in Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet* **56**, 112-5 (1995).
17. Moore, S.W. The contribution of associated congenital anomalies in understanding Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* **22**, 305-15 (2006).
18. Yoon, G. *et al.* Neuroblastoma in a patient with the Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS). *Med Pediatr Oncol* **38**, 193-9 (2002).
19. George, R.E., Lipshultz, S.E., Lipsitz, S.R., Colan, S.D. & Diller, L. Association between congenital cardiovascular malformations and neuroblastoma. *J Pediatr* **144**, 444-8 (2004).
20. Park, J.R., Eggert, A. & Caron, H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am* **24**, 65-86 (2010).
21. Maris, J.M., Hogarty, M.D., Bagatell, R. & Cohn, S.L. Neuroblastoma. *Lancet* **369**, 2106-20 (2007).
22. Colon, N.C. & Chung, D.H. Neuroblastoma. *Adv Pediatr* **58**, 297-311 (2011).
23. Perel, Y. *et al.* [Prognosis of neuroblastoma in childhood. Methods of assessment and clinical use]. *Arch Pediatr* **11**, 834-42 (2004).
24. Yamamoto, K. *et al.* Mass screening and age-specific incidence of neuroblastoma in Saitama Prefecture, Japan. *J Clin Oncol* **13**, 2033-8 (1995).
25. Hiyama, E. *et al.* Effectiveness of screening for neuroblastoma at 6 months of age: a retrospective population-based cohort study. *Lancet* **371**, 1173-80 (2008).
26. Woods, W.G. *et al.* Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med* **346**, 1041-6 (2002).
27. Nickerson, H.J. *et al.* Favorable biology and outcome of stage IV-S neuroblastoma with supportive care or minimal therapy: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* **18**, 477-86 (2000).
28. Perez, C.A. *et al.* 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**, 18-26 (2000).

29. Baker, D.L. *et al.* Outcome after reduced chemotherapy for intermediate-risk neuroblastoma. *N Engl J Med* **363**, 1313-23 (2010).
30. Matthay, K.K. *et al.* Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *J Clin Oncol* **27**, 1007-13 (2009).
31. Lonergan, G.J., Schwab, C.M., Suarez, E.S. & Carlson, C.L. Neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and ganglioneuroma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics* **22**, 911-34 (2002).
32. Cecchetto, G. *et al.* Surgical risk factors in primary surgery for localized neuroblastoma: the LNESG1 study of the European International Society of Pediatric Oncology Neuroblastoma Group. *J Clin Oncol* **23**, 8483-9 (2005).
33. Brodeur, G.M. *et al.* Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* **11**, 1466-77 (1993).
34. London, W.B. *et al.* Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* **23**, 6459-65 (2005).
35. George, R.E. *et al.* Hyperdiploidy plus nonamplified MYCN confers a favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* **23**, 6466-73 (2005).
36. Schmidt, M.L. *et al.* Favorable prognosis for patients 12 to 18 months of age with stage 4 nonamplified MYCN neuroblastoma: a Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol* **23**, 6474-80 (2005).
37. Shimada, H. *et al.* Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* **73**, 405-16 (1984).
38. Shimada, H. *et al.* The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* **86**, 364-72 (1999).
39. Peuchmaur, M. *et al.* Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer* **98**, 2274-81 (2003).
40. Brodeur, G.M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* **3**, 203-16 (2003).
41. Mestdagh, P. *et al.* An integrative genomics screen uncovers ncRNA T-UCR functions in neuroblastoma tumours. *Oncogene* **29**, 3583-92 (2010).

42. Ho, R. *et al.* Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res* **62**, 6462-6 (2002).
43. Brodeur, G.M. *et al.* Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin Cancer Res* **15**, 3244-50 (2009).
44. Schwab, M. *et al.* Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* **305**, 245-8 (1983).
45. Bown, N. Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. *J Clin Pathol* **54**, 897-910 (2001).
46. Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E. & Bishop, J.M. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* **224**, 1121-4 (1984).
47. Seeger, R.C. *et al.* Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* **313**, 1111-6 (1985).
48. Bown, N. *et al.* Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* **340**, 1954-61 (1999).
49. Fisher, J.P. & Tweddle, D.A. Neonatal neuroblastoma. *Semin Fetal Neonatal Med* **17**, 207-15 (2012).
50. Gilbert, F. *et al.* Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17. *Cancer Res* **44**, 5444-9 (1984).
51. Fujita, T. *et al.* CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* **100**, 940-9 (2008).
52. Attiyeh, E.F. *et al.* Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* **353**, 2243-53 (2005).
53. Pérel, Y. *et al.* [Prognosis of neuroblastoma in childhood. Methods of assessment and clinical use]. *Arch Pediatr* **11**, 834-42 (2004).
54. Hara, J. Development of treatment strategies for advanced neuroblastoma. *Int J Clin Oncol* **17**, 196-203 (2012).
55. Mosse, Y.P. *et al.* Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* **455**, 930-5 (2008).
56. Hirota, T. *et al.* Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* **114**, 585-98 (2003).

57. Shang, X. *et al.* Aurora A is a negative prognostic factor and a new therapeutic target in human neuroblastoma. *Mol Cancer Ther* **8**, 2461-9 (2009).
58. Maris, J.M. *et al.* Initial testing of the aurora kinase A inhibitor MLN8237 by the Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP). *Pediatr Blood Cancer* **55**, 26-34 (2010).
59. Barbacid, M. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 148-55 (1995).
60. Nakagawara, A. *et al.* Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* **328**, 847-54 (1993).
61. Nakagawara, A., Arima, M., Azar, C.G., Scavarda, N.J. & Brodeur, G.M. Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. *Cancer Res* **52**, 1364-8 (1992).
62. Nakagawara, A., Azar, C.G., Scavarda, N.J. & Brodeur, G.M. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* **14**, 759-67 (1994).
63. Svensson, T. *et al.* Coexpression of mRNA for the full-length neurotrophin receptor trk-C and trk-A in favourable neuroblastoma. *Eur J Cancer* **33**, 2058-63 (1997).
64. Evans, A.E. *et al.* Antitumor activity of CEP-751 (KT-6587) on human neuroblastoma and medulloblastoma xenografts. *Clin Cancer Res* **5**, 3594-602 (1999).
65. Acheson, A. *et al.* A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* **374**, 450-3 (1995).
66. Matsumoto, K., Wada, R.K., Yamashiro, J.M., Kaplan, D.R. & Thiele, C.J. Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. *Cancer Res* **55**, 1798-806 (1995).
67. Cheung, N.V. & Heller, G. Chemotherapy dose intensity correlates strongly with response, median survival, and median progression-free survival in metastatic neuroblastoma. *J Clin Oncol* **9**, 1050-8 (1991).
68. Hoare, M., Young, A.R. & Narita, M. Autophagy in cancer: having your cake and eating it. *Semin Cancer Biol* **21**, 397-404 (2011).
69. White, E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* **12**, 401-10 (2012).

70. Zhou, S. *et al.* Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Cancer Lett* **323**, 115-27 (2012).
71. Clark, S.L., Jr. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol* **3**, 349-62 (1957).
72. Maes, H., Rubio, N., Garg, A.D. & Agostinis, P. Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. *Trends Mol Med* (2013).
73. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**, 107-32 (2011).
74. Hailey, D.W. *et al.* Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* **141**, 656-67 (2010).
75. Tooze, S.A. & Yoshimori, T. The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* **12**, 831-5 (2010).
76. Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C. & Rubinsztein, D.C. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* **12**, 747-57 (2010).
77. Ohsumi, Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 211-6 (2001).
78. Meley, D., Pattingre, S. & Codogno, P. [PI3 kinases and the control of autophagia]. *Bull Cancer* **93**, 439-44 (2006).
79. He, C. & Klionsky, D.J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* **43**, 67-93 (2009).
80. Guertin, D.A. & Sabatini, D.M. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* **12**, 9-22 (2007).
81. Tee, A.R., Manning, B.D., Roux, P.P., Cantley, L.C. & Blenis, J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol* **13**, 1259-68 (2003).
82. Nicholson, K.M. & Anderson, N.G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* **14**, 381-95 (2002).
83. Liu, J.J., Lin, M., Yu, J.Y., Liu, B. & Bao, J.K. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Lett* **300**, 105-14 (2011).

84. Liang, J. *et al.* The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol* **9**, 218-24 (2007).
85. Chen, N. & Debnath, J. Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Lett* **584**, 1427-35 (2010).
86. Jung, C.H., Ro, S.H., Cao, J., Otto, N.M. & Kim, D.H. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* **584**, 1287-95 (2010).
87. Shaw, R.J. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol (Oxf)* **196**, 65-80 (2009).
88. Zong, W.X. & Moll, U. p53 in autophagy control. *Cell Cycle* **7**, 2947 (2008).
89. Pattingre, S., Bauvy, C. & Codogno, P. Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells. *J Biol Chem* **278**, 16667-74 (2003).
90. Pattingre, S. *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927-39 (2005).
91. Simonsen, A. & Tooze, S.A. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol* **186**, 773-82 (2009).
92. Levine, B. & Deretic, V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **7**, 767-77 (2007).
93. Ogata, M. *et al.* Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* **26**, 9220-31 (2006).
94. Maiuri, M.C. *et al.* Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* **26**, 2527-39 (2007).
95. Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M. & Levine, B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* **30**, 678-88 (2008).
96. Zalckvar, E. *et al.* DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep* **10**, 285-92 (2009).
97. Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728-41 (2011).

98. Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. & Ohsumi, Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* **119**, 301-11 (1992).
99. Onodera, J. & Ohsumi, Y. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem* **280**, 31582-6 (2005).
100. Amaravadi, R.K. & Thompson, C.B. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res* **13**, 7271-9 (2007).
101. Levine, B. & Klionsky, D.J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **6**, 463-77 (2004).
102. Young, A.R. *et al.* Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* **23**, 798-803 (2009).
103. Deretic, V. & Levine, B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* **5**, 527-49 (2009).
104. Klionsky, D.J. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* **118**, 7-18 (2005).
105. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M. & Klionsky, D.J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**, 1069-75 (2008).
106. Chen, Y., Azad, M.B. & Gibson, S.B. Methods for detecting autophagy and determining autophagy-induced cell death. *Can J Physiol Pharmacol* **88**, 285-95 (2010).
107. Platini, F., Perez-Tomas, R., Ambrosio, S. & Tessitore, L. Understanding autophagy in cell death control. *Curr Pharm Des* **16**, 101-13 (2010).
108. Bursch, W. *et al.* Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* **17**, 1595-607 (1996).
109. Bursch, W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* **8**, 569-81 (2001).
110. Shimizu, S. *et al.* Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* **6**, 1221-8 (2004).
111. Gonzalez-Polo, R.A. *et al.* The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci* **118**, 3091-102 (2005).

112. Yousefi, S. & Simon, H.U. Apoptosis regulation by autophagy gene 5. *Crit Rev Oncol Hematol* **63**, 241-4 (2007).
113. Yousefi, S. *et al.* Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* **8**, 1124-32 (2006).
114. Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J. & Heintz, N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15077-82 (2003).
115. Iqbal, J. *et al.* Genomic analyses reveal global functional alterations that promote tumor growth and novel tumor suppressor genes in natural killer-cell malignancies. *Leukemia* **23**, 1139-51 (2009).
116. Qu, X. *et al.* Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* **112**, 1809-20 (2003).
117. Degenhardt, K. *et al.* Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **10**, 51-64 (2006).
118. Marino, G. *et al.* Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem* **282**, 18573-83 (2007).
119. Liang, X.H. *et al.* Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**, 672-6 (1999).
120. Miracco, C. *et al.* Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. *Int J Oncol* **30**, 429-36 (2007).
121. Kang, M.R. *et al.* Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *J Pathol* **217**, 702-6 (2009).
122. Coppola, D. *et al.* Down-regulation of Bax-interacting factor-1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer* **113**, 2665-70 (2008).
123. Yang, S. *et al.* Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev* **25**, 717-29 (2011).
124. Fung, C., Lock, R., Gao, S., Salas, E. & Debnath, J. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell* **19**, 797-806 (2008).
125. Lisanti, M.P. *et al.* Understanding the "lethal" drivers of tumor-stroma co-evolution: emerging role(s) for hypoxia, oxidative stress and autophagy/mitophagy in the tumor micro-environment. *Cancer Biol Ther* **10**, 537-42 (2010).

126. Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R. & Kondo, S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* **5**, 726-34 (2005).
127. Moretti, L., Yang, E.S., Kim, K.W. & Lu, B. Autophagy signaling in cancer and its potential as novel target to improve anticancer therapy. *Drug Resist Updat* **10**, 135-43 (2007).
128. Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C. & Menendez, J.A. Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab. *PLoS ONE* **4**, e6251 (2009).
129. Schoenlein, P.V., Periyasamy-Thandavan, S., Samaddar, J.S., Jackson, W.H. & Barrett, J.T. Autophagy facilitates the progression of ERalpha-positive breast cancer cells to antiestrogen resistance. *Autophagy* **5**, 400-3 (2009).
130. Liu, D., Yang, Y., Liu, Q. & Wang, J. Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Med Oncol* **28**, 105-11 (2011).
131. Claerhout, S. *et al.* Concomitant inhibition of AKT and autophagy is required for efficient cisplatin-induced apoptosis of metastatic skin carcinoma. *Int J Cancer* **127**, 2790-803 (2010).
132. Degtyarev, M. *et al.* Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents. *J Cell Biol* **183**, 101-16 (2008).
133. Ito, H., Daido, S., Kanzawa, T., Kondo, S. & Kondo, Y. Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells. *Int J Oncol* **26**, 1401-10 (2005).
134. Lomonaco, S.L. *et al.* The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells. *Int J Cancer* **125**, 717-22 (2009).
135. Shanmugam, M. *et al.* Targeting glucose consumption and autophagy in myeloma with the novel nucleoside analogue 8-aminoadenosine. *J Biol Chem* **284**, 26816-30 (2009).
136. Abedin, M.J., Wang, D., McDonnell, M.A., Lehmann, U. & Kelekar, A. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differ* **14**, 500-10 (2007).
137. Carew, J.S. *et al.* Autophagy inhibition enhances vorinostat-induced apoptosis via ubiquitinated protein accumulation. *J Cell Mol Med* **14**, 2448-59 (2010).

138. Apel, A., Herr, I., Schwarz, H., Rodemann, H.P. & Mayer, A. Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer Res* **68**, 1485-94 (2008).
139. Kim, R.H. *et al.* Arginine deiminase as a novel therapy for prostate cancer induces autophagy and caspase-independent apoptosis. *Cancer Res* **69**, 700-8 (2009).
140. Ruiz-Irastorza, G., Ramos-Casals, M., Brito-Zeron, P. & Khamashta, M.A. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Ann Rheum Dis* **69**, 20-8 (2010).
141. Solomon, V.R. & Lee, H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur J Pharmacol* **625**, 220-33 (2009).
142. Stelton, C.R., Connors, D.B., Walia, S.S. & Walia, H.S. Hydrochloroquine retinopathy: characteristic presentation with review of screening. *Clin Rheumatol* **32**, 895-8 (2013).
143. Townsend, K.N. *et al.* Autophagy inhibition in cancer therapy: metabolic considerations for antitumor immunity. *Immunol Rev* **249**, 176-94 (2012).
144. Shakib, K., Schratzenholz, A. & Soskic, V. Stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* **49**, 503-6 (2011).
145. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. & Weissman, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-11 (2001).
146. Dick, J.E. Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat Biotechnol* **27**, 44-6 (2009).
147. Lapidot, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645-8 (1994).
148. Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J. & Clarke, M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3983-8 (2003).
149. Tang, C., Ang, B.T. & Pervaiz, S. Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. *FASEB J* **21**, 3777-85 (2007).
150. Subramaniam, D., Ramalingam, S., Houchen, C.W. & Anant, S. Cancer stem cells: a novel paradigm for cancer prevention and treatment. *Mini Rev Med Chem* **10**, 359-71 (2010).

151. Siapati, E.K., Rouka, E., Kyriakou, D. & Vassilopoulos, G. Neuroblastoma cells negative for CD44 possess tumor-initiating properties. *Cell Oncol (Dordr)* **34**, 189-97 (2011).
152. Landen, C.N., Jr. *et al.* Targeting aldehyde dehydrogenase cancer stem cells in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* **9**, 3186-99 (2010).
153. Subramaniam, D., Ramalingam, S., Houchen, C.W. & Anant, S. Cancer stem cells: a novel paradigm for cancer prevention and treatment. *Mini Rev Med Chem* **10**, 359-71 (2010).
154. Singh, S.K. *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**, 5821-8 (2003).
155. Singh, S.K. *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396-401 (2004).
156. Cournoyer, S. *et al.* Genotype analysis of tumor-initiating cells expressing CD133 in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* **51**, 792-804 (2012).
157. Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756-60 (2006).
158. Dean, M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **14**, 3-9 (2009).
159. Guo, Y., Follo, M., Geiger, K., Lubbert, M. & Engelhardt, M. Side-population cells from different precursor compartments. *J Hematother Stem Cell Res* **12**, 71-82 (2003).
160. Bao, S. *et al.* Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* **66**, 7843-8 (2006).
161. Phillips, T.M., McBride, W.H. & Pajonk, F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* **98**, 1777-85 (2006).
162. Liu, G. *et al.* Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* **5**, 67 (2006).
163. Yu, C.C. *et al.* Medulloblastoma-derived tumor stem-like cells acquired resistance to TRAIL-induced apoptosis and radiosensitivity. *Childs Nerv Syst* **26**, 897-904 (2010).
164. National Geographic Society. Bird evolution.

165. Maris, J.M. The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. *Curr Opin Pediatr* **17**, 7-13 (2005).
166. Paglin, S. *et al.* A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* **61**, 439-44 (2001).
167. Burkhardt, C.A. *et al.* Small-molecule multidrug resistance-associated protein 1 inhibitor reversan increases the therapeutic index of chemotherapy in mouse models of neuroblastoma. *Cancer Res* **69**, 6573-80 (2009).
168. Jiang, H. *et al.* Marchantin M: a novel inhibitor of proteasome induces autophagic cell death in prostate cancer cells. *Cell Death Dis* **4**, e761 (2013).
169. Shao, Y., Gao, Z., Marks, P.A. & Jiang, X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 18030-5 (2004).
170. Ma, X.H. *et al.* Measurements of tumor cell autophagy predict invasiveness, resistance to chemotherapy, and survival in melanoma. *Clin Cancer Res* **17**, 3478-89 (2011).
171. Chen, Y. *et al.* Autophagy-related proteins LC3 and Beclin-1 impact the efficacy of chemoradiation on esophageal squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract* (2013).
172. Lin, C.I. *et al.* Autophagy: a new target for advanced papillary thyroid cancer therapy. *Surgery* **146**, 1208-14 (2009).
173. Xing, C., Zhu, B., Liu, H., Yao, H. & Zhang, L. Class I phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 activates autophagy and induces apoptosis through p53 pathway in gastric cancer cell line SGC7901. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **40**, 194-201 (2008).
174. Yang, Y.P., Liang, Z.Q., Gu, Z.L. & Qin, Z.H. Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin* **26**, 1421-34 (2005).
175. Tsuneoka, M. *et al.* c-myc induces autophagy in rat 3Y1 fibroblast cells. *Cell Struct Funct* **28**, 195-204 (2003).
176. Qadir, M.A. *et al.* Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization. *Breast Cancer Res Treat* **112**, 389-403 (2008).
177. Maycotte, P. *et al.* Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. *Autophagy* **8**, 200-12 (2012).

178. Ben-Zvi, I., Kivity, S., Langevitz, P. & Shoenfeld, Y. Hydroxychloroquine: from malaria to autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* **42**, 145-53 (2012).
179. Xie, X., White, E.P. & Mehnert, J.M. Coordinate autophagy and mTOR pathway inhibition enhances cell death in melanoma. *PLoS ONE* **8**, e55096 (2013).
180. Lagneaux, L. *et al.* Early induction of apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia cells by hydroxychloroquine: activation of caspase-3 and no protection by survival factors. *Br J Haematol* **112**, 344-52 (2001).
181. Yang, Z.J., Chee, C.E., Huang, S. & Sinicrope, F.A. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* **10**, 1533-41 (2011).
182. Shen, S. *et al.* Association and dissociation of autophagy, apoptosis and necrosis by systematic chemical study. *Oncogene* **30**, 4544-56 (2011).
183. Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A. & Kroemer, G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 741-52 (2007).
184. Liang, X. *et al.* Inhibiting systemic autophagy during interleukin 2 immunotherapy promotes long-term tumor regression. *Cancer Res* **72**, 2791-801 (2012).
185. Kanzawa, T. *et al.* Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ* **11**, 448-57 (2004).
186. Sotelo, J., Briceno, E. & Lopez-Gonzalez, M.A. Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* **144**, 337-43 (2006).
187. Ding, Z.B. *et al.* Autophagy activation in hepatocellular carcinoma contributes to the tolerance of oxaliplatin via reactive oxygen species modulation. *Clin Cancer Res* **17**, 6229-38 (2011).
188. Yu, Z., Pestell, T.G., Lisanti, M.P. & Pestell, R.G. Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* **44**, 2144-51 (2012).
189. Wu, S., Wang, X., Chen, J. & Chen, Y. Autophagy of cancer stem cells is involved with chemoresistance of colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **434**, 898-903 (2013).
190. Cufi, S. *et al.* Autophagy positively regulates the CD44(+) CD24(-/low) breast cancer stem-like phenotype. *Cell Cycle* **10**, 3871-85 (2011).

