

Université de Montréal

**Caractérisation des modifications épigénétiques et de la sensibilité
pharmacologique de nouveaux modèles de sphéroïdes de
neuroblastome**

Par

Mariya Kryvoshey

Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en pharmacologie, option générale

Janvier 2022

© Mariya Kryvoshey, 2022

Université de Montréal

Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

**Caractérisation des modifications épigénétiques et de la sensibilité
pharmacologique de nouveaux modèles de sphéroïdes de
neuroblastome**

Présenté par

Mariya Kryvoshey

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Maja Krajinovic

Président-rapporteur

Noël J-M. Raynal

Directeur de recherche

Sébastien Talbot

Membre du jury

Résumé

Le neuroblastome à haut risque est caractérisé par un faible taux de survie (~30%) et des récurrences fréquentes, malgré les traitements multimodaux existants. Généralement, les études d'évaluation des médicaments utilisent la culture cellulaire en 2D, mais elle ne reflète pas la biologie tumorale du neuroblastome *in situ*, incluant les caractéristiques associées à l'hypoxie et la densité cellulaire. En comparaison aux patients, la culture cellulaire conventionnelle semble altérer le phénotype cellulaire du neuroblastome, le transcriptome et l'épigénome qui affecteront, à leur tour, les résultats des études pharmacologiques. Ainsi, un nouveau modèle de culture cellulaire en 3D a été développé avec plusieurs lignées cellulaires de neuroblastome afin d'atteindre une culture de sphéroïdes à long terme (un mois) avec un taux de viabilité convenable. L'hypothèse de recherche est que les changements épigénétiques et transcriptionnels seront induits par l'adaptation en 3D et vont s'amplifier dans le temps lors de la culture en 3D. Ces changements ont été mesurés en 3D dans le temps pour identifier le moment où l'épigénome des sphéroïdes ressemble le plus à celui des patients à haut risque. Le changement de l'expression des régulateurs épigénétiques survient 24 jours après la mise en sphéroïde, ce qui se traduit par une différence dans la sensibilité aux médicaments épigénétiques par rapport à la culture 2D. En conclusion, notre étude nous a permis de dériver des nouveaux modèles de neuroblastome qui sont plus représentatifs des patients d'un point de vue épigénétique et pharmacologique.

Mots-clés : cancer pédiatrique, neuroblastome, culture cellulaire 3D, sphéroïde, épigénétique, pharmacologie, MYCN, criblage de composés épigénétiques.

Abstract

High-risk neuroblastoma is characterized by a low survival rate (~30%) and frequent recurrences, despite all the multimodal treatments available to date. Typically, drug evaluation studies use 2D cell culture which does not reflect well the tumor biology of neuroblastoma *in situ*, including features associated with hypoxia and cell density. Thus, compared to patients data, the conventional 2D cell culture seems to alter the neuroblastoma cell phenotype, transcriptome and epigenome which in turn will affect the results of pharmacological studies. A new 3D cell culture model was developed with several neuroblastoma cell lines to achieve long term spheroid culture (up to one month) with a suitable viability rate. We hypothesized that transcriptional and epigenetic changes will be induced by 3D adaptation and will amplify over time in the cells cultured in 3D. All these changes were measured by Western Blot in 2D, in short term 3D and in long term 3D to identify the timepoint when the epigenome of the spheroids most closely resembles that of the patient. We found that the occurrence of changes in epigenetic regulator expression occurs after 24 days of spheroid culture, resulting in a difference in a drug sensitivity compared to 2D culture. In summary, we developed new neuroblastoma models that are more representative of patient's epigenome and pharmacological sensitivity.

Keywords : pediatric cancer, neuroblastoma, 3D cell culture, spheroid, epigenetic, pharmacology, MYCN, epigenetic screening.

Table des matières

Résumé.....	1
Abstract.....	2
Table des matières.....	3
Liste des tableaux.....	6
Liste des figures.....	7
Liste des sigles et abréviations.....	9
Dédicace.....	15
Remerciements.....	16
Introduction.....	19
Chapitre 1 : Le neuroblastome	19
1.1 Historique	19
1.2 Origine cellulaire et cause du neuroblastome.....	20
1.3 Épidémiologie descriptive du neuroblastome pédiatrique.....	24
1.4 Hétérogénéité clinique.....	26
1.5 Facteurs pronostiques et groupes de risque.....	28
1.5.1 Âge du patient au moment du diagnostic.....	28
1.5.2 Histopathologie tumorale.....	28
1.5.3 Statut de l'amplification de l'oncogène <i>MYCN</i>	30
1.5.4 Ploidie des cellules tumorales.....	30
1.5.5 Taux de survie en fonction du groupe de risque selon COG.....	30
1.6 Classification du neuroblastome.....	32
1.7 Thérapie multimodale du neuroblastome.....	35
1.7.1 Traitement du neuroblastome de risque faible.....	36

1.7.2 Traitement du neuroblastome de risque intermédiaire.....	37
1.7.3 Traitement du neuroblastome de risque élevé.....	37
1.7.3.1 Phase d'induction.....	38
1.7.3.2 Phase de consolidation.....	39
1.7.3.3 Phase de maintenance.....	39
1.7.4 Traitement du neuroblastome réfractaire ou récidivant.....	40
Chapitre 2 : Rôle de la génétique dans le neuroblastome.....	41
2.1 Altération génétiques.....	41
2.1.1 Amplification de l'oncogène <i>MYCN</i>	43
2.1.1.1 Importance de <i>MYCN</i> dans le neuroblastome pédiatrique.....	43
2.1.1.2 Développement de modèle murin de neuroblastome impliquant <i>MYCN</i> ..	44
2.1.1.3 Structure et fonction de <i>MYCN</i>	44
2.1.1.4 Rôle de <i>MYCN</i> dans la progression tumorale du neuroblastome.....	46
2.1.1.5 Traitements du neuroblastome ciblant l'oncogène <i>MYCN</i>	48
2.1.2 Mutation activatrice du gène <i>ALK</i>	49
2.1.2.1 Mécanisme et conséquence des mutations d' <i>ALK</i>	49
2.1.2.2 Mutations retrouvées dans <i>ALK</i>	50
2.1.2.3 Traitements du neuroblastome ciblant les mutations dans <i>ALK</i>	51
2.1.3 Mutation inactivatrice du gène <i>PHOX2B</i>	52
2.1.3.1 Rôle des mutations de <i>PHOX2B</i> dans le neuroblastome familial.....	52
2.1.3.2 Traitements du neuroblastome ciblant les mutations dans <i>PHOX2B</i>	53
2.1.4 Autres mutations dans le neuroblastome.....	53
2.1.4.1 <i>PTPN11</i>	53
2.1.4.2 <i>ATRX</i>	53

2.1.4.3 ARID1A/1B.....	54
2.2 Aberrations chromosomiques dans le neuroblastome.....	54
2.2.1 Gain du chromosome 17q.....	55
2.2.2 Perte du chromosome 11q.....	55
2.2.3 Perte du chromosome 1p.....	56
Chapitre 3 : Rôle de l'épigénétique dans le neuroblastome.....	57
3.1 Méthylation de l'ADN.....	59
3.1.1 Généralités.....	59
3.1.2 Hypométhylation et hyperméthylation de l'ADN dans les cellules tumorales.....	59
3.1.3 Méthylation de l'ADN.....	61
3.1.4 Déméthylation de l'ADN.....	61
3.1.5 Méthylation de l'ADN comme cible thérapeutique dans le neuroblastome.....	62
3.2 Modifications post-traductionnelles des histones et remodelage de la chromatine.....	63
3.2.1 Acétylation des histones.....	63
3.2.2 Désacétylation des histones.....	64
3.2.3 Méthylation des histones.....	65
3.2.3 Déméthylation des histones.....	65
Hypothèse et objectifs.....	66
Matériels et méthodes.....	67
Résultats.....	74
Discussion.....	92
Conclusion.....	101
Références bibliographiques.....	102
Annexe.....	119

Liste des tableaux

Tableau I : Stades du neuroblastome selon la classification du système postopératoire INSS.....	32
Tableau II : Évaluation pronostique du neuroblastome selon la classification INPC.....	33
Tableau III : Stades du neuroblastome selon la classification du système préopératoire INRGSS...	34
Tableau IV : Gènes avec une fréquence significative de mutation somatique dans 240 tumeurs de neuroblastome à haut risque.....	42
Tableau V : Corrélation entre l'amplification de <i>MYCN</i> , le stade de cancer et le taux de survie des patients.....	43
Tableau VI : Inhibiteurs indirects de l'oncogène <i>MYCN</i> pour le traitement de neuroblastome.....	48
Tableau VII : Mutations germinales et somatiques d'ALK.....	50
Tableau VIII. Description des lignées cellulaires de neuroblastome utilisées pour le développement de la culture en 3D.....	68
Tableau IX. Liste des anticorps primaires utilisées pour détecter les niveaux d'expression des protéines isolées.....	70
Tableau X. Liste des anticorps primaires utilisées pour détecter les marques d'acétylation et de méthylation sur l'histone H3.....	70
Tableau XI. Les lignées cellulaires de neuroblastome utilisées pour le développement et la caractérisation de la culture en 3D.....	74
Tableau XII. Doses circulante et intra-tumorale des deux traitements de la chimiothérapie couramment utilisés pour le neuroblastome.....	84
Tableau XIII. Répartition des 181 composés de la librairie épigénétique.....	91
Tableau XIV. Les 5 composés sélectionnés pour les deux lignées de neuroblastome après le criblage d'une librairie génétique de 181 composés.....	91
Tableau S1. IMR-32 : Niveau d'expression des régulateurs épigénétiques dans le temps (n=3)...	121
Tableau S2. SK-N-AS : Niveau d'expression des régulateurs épigénétiques dans le temps (n=3)...	122
Tableau S3. IGR-N-91 : Niveau d'expression des régulateurs épigénétiques dans le temps (n=3)	122
Tableau S4. Liste de 181 composés de la librairie épigénétique.....	123

Liste des figures

Figure 1 : Processus du développement de la crête neurale.....	21
Figure 2 : Réseau de signaux moléculaires intervenant dans la formation de la crête neurale et la spécification des cellules de la crête neurale.....	22
Figure 3 : Évènements et facteurs génétiques influençant la maturation de la crête neurale et l'initiation du développement du neuroblastome.....	23
Figure 4 : Incidence des cancers de l'enfant pour le groupe d'âge de 0 à 14 ans.....	25
Figure 5 : Principaux sous-types histopathologiques des tumeurs neuroblastiques.....	29
Figure 6 : Courbes de survie des patients atteints de neuroblastome selon le groupe de risque....	31
Figure 7 : Comparaison des thérapies du neuroblastome en fonction du groupe de risque.....	35
Figure 8 : Structure et régions fonctionnels de MYCN et de son partenaire d'interaction MAX.....	45
Figure 9 : Organisation du matériel génétique dans la cellule et les mécanismes épigénétiques...	58
Figure 10 : Distribution de la méthylation dans l'ADN et son influence sur l'expression des gènes.....	60
Figure 11 : Mise au point et caractérisation du modèle de culture des sphéroïdes de la lignée cellulaire IGR-N-91.....	76
Figure 12 : Caractérisation des trois modèles de culture en 3D : IGR-N-91, SK-N-AS et IMR-32.....	79
Figure 13 : Quantification en 2D et en 3D des changements d'expression de plusieurs régulateurs épigénétiques importants pour le pronostic chez le patient dans les trois modèles de culture en 3D du neuroblastome.....	82
Figure 14 : Quantification en 2D et en 3D des changements d'expression de plusieurs marques d'acétylation et de méthylation d'histone H3 reliées aux régulateurs épigénétiques pour les modèles en 3D avec la lignée IMR-32.....	83
Figure 15 : Traitement en 2D et en 3D de lignée cellulaire MYCN amplifiée, IMR-32, avec les composés de la chimiothérapie utilisés dans le neuroblastome pédiatrique.....	85
Figure 16 : Criblage en 2D et en 3D de 181 composés épigénétiques sur la lignée cellulaire MYCN non amplifiée SK-N-AS et sur la lignée MYCN amplifiée IMR-32.....	88

Figure 17 : Courbes de dose-réponse en 2D et en 3D des 5 composés épigénétiques sélectionnés suite au criblage d'une librairie de 181 composés pour les lignées SK-N-AS et IMR-32.....**91**

Figure S1 : Développement du modèle de culture des sphéroïdes de la lignée IGR-N-91.....**120**

Figure S2 : Quantification en 2D et en 3D des changements d'expression de plusieurs marques d'acétylation et de méthylation d'histone H3 reliées aux régulateurs épigénétiques pour le modèle en 3D avec la lignée SK-N-AS.....**121**

Liste des sigles et abréviations

ADA2 : adénosine désaminase 2

ADN : acide désoxyribonucléique

ALK : anaplastic lymphoma kinase

ALL : acute lymphoblastic leukemia

ALT : alternative lengthening of telomeres

AML : acute myeloid leukemia

ARID1A/ARID1B : AT-rich interactive domain 1A/1B

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATCC : American Type Culture Collection

ATRX : alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked

BET : bromodomain and extra-terminal domain

BMP : bone morphogenetic protein

BR : basic region

BRG1 : Brahma-related gene-1

BuMel : busulfan et melphalan

CAF : cancer-associated fibroblasts

CCN : cellules de la crête neurale

CDK4 : cyclin-dependent kinase 4

CDKL5 : cyclin-dependent kinase-like 5

CEM : carboplatine, étoposide et melphalan

CHK1 : checkpoint kinase 1

CIMP : CpG island methylator phenotype

CN : crête neurale

COG : Children's Oncology Group

DAC : 5-aza-2'-désoxycytidine

DCR2 : decoy receptor 2

DLL3 : Delta-like ligand 3

DMEM : Dubelcco's Modified Eagle Medium

DMSO : diméthylsulfoxyde

DNMT : ADN méthyltransférase

E-box : enhancer-box

ECL : enhanced chemiluminescence

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

EHMT2 : histone-lysine N-méthyltransférase 2 euchromatique

EMEM : Eagle's Minimum Essential Medium

ERK : extracellular signal-regulated kinase

EZH2 : Enhancer of zeste homolog 2

F12K : Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium

FAK : focal adhesion kinase

FBS : Fetal Bovin Serum

FDA : Food and Drug Administration

FGF : Fibroblast Growth Factor

GCN5 : General Control Non-repressed 5

GD2 : disialoganglioside

GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GNAT : N-acétyltransférases liées à GCN5

GWAS : genome-wide association studies

H3 : histone 3

h : heures

HAT : histone acétyltransférase

HDAC : histone désacétylase

HIF-1 α : Hypoxia-inducible factor 1-alpha

HLH-LZ : helix-loop-helix-leucine zipper

HMT : histone méthyltransférase

HP1 : protéine hétérochromatine 1

¹³¹I-MIBG : iodine-131-metaiodobenzylguanidine

IDRF : image-defined risk factors

IL-2 : interleukine-2

INRGSS : International Neuroblastoma Risk Group Staging System

INSS : International Neuroblastoma Staging System

INPC : International Neuroblastoma Pathology Classification

KAT : lysine acétyltransférase

KLF2 : Kruppel-like factor 2

LSD1 : Lysine-specific demethylase 1

m : minutes

MAPK : Protéine kinase activée par des mitogènes

MAX : Myc-associated factor X

Mb : mégabase

MBD : domaine de liaison méthyl-CpG

MCP-1/CCL2 : monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2

MDM2 : mouse double minute 2

MeCP2 : protéine de liaison méthyl-CpG 2

MKI : mitosis-karyorrhexis index

mTOR : mammalian target of rapamycin

NaCl : chlorure de sodium

NaF : fluorure de sodium

NGF : nerve growth factor

NK : Natural Killer

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCAF : facteur associé à P300/CBP

PCR : réaction en chaîne de la polymérase

PHOX2B : paired-like homeobox 2

PI3 : phosphatidylinositol-3

PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase

PIC : cocktail d'inhibiteurs de protéase

PMSF : fluorure de phénylméthylsulfonyle

PRMT : protéine méthyltransférase

PTPN11 : protein tyrosine phosphatase 11

PVDF : polyvinylidene fluoride

RASSF1A : Ras Association Domain Family Protein 1 isoform A

SAHA : suberoylanilide hydroxamic acid

SAM : S-adénosylméthionine

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SIOPEN : International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma

SKP2 : S-Phase Kinase Associated Protein 2

SNC : système nerveux central

TARGET : Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments

TEB : triton extraction buffer

TEM : transition épithélio-mésenchymateuse

TET : ten-eleven translocation

TH : tyrosine hydroxylase

TP53 : tumor protein 53

TP53INP1 : Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 1

TRKA : récepteur kinase à tropomyosine A

TRKB : récepteur kinase à tropomyosine B

TSLC1/IGSF4/CADM1 : tumor suppressor in lung cancer 1/immunoglobulin superfamily 4/cell adhesion molecule 1

VEGF : vascular endothelial growth factor

WES : whole exome sequencing

WGS : whole genome sequencing

Je dédie ce mémoire

À ceux que j'aime,

Ma mère, ma grand-mère et toi, Vadim.

Remerciements

Je tiens à remercier plusieurs personnes qui m'ont soutenu durant ces deux belles années d'études. Sachez que je vous apprécie tous énormément et que sans vous cette maîtrise n'aurait pas été possible ! Je pourrais écrire des pages sur chacun, mais je serais concise.

Je remercie tout d'abord mon directeur de recherche, **Dr. Noël Raynal**, pour m'avoir accepté dans son laboratoire. Si j'avais le choix de revenir en arrière, je choisirais toujours ce laboratoire. Sa passion pour l'épigénétique et la culture cellulaire en 3D est contagieuse et m'a permis de découvrir beaucoup de nouvelles choses sur ces sujets. Non seulement c'est un expert dans son domaine, mais il a une très bonne personnalité. Il tient beaucoup aux relations entre les membres du laboratoire et à la réussite de ces étudiants. Son support tout au long de mon projet est inestimable. Il a été disponible pour les discussions à n'importe quel moment et il m'a poussé plus loin dans la compréhension des résultats obtenus et la réflexion sur les expériences futures. Je vais toujours me souvenir de la phrase « *Sky is the limit* » lors de notre première rencontre.

Par la suite, je suis très reconnaissante aux **Dr. Talbot** et **Dr. Krajinovic** d'avoir consacré de leur temps pour évaluer mon mémoire. Je suis honorée de bénéficier de votre expertise.

Je ne peux passer sous silence l'appui de mes chers collègues, **Walid** et **Manu**. Une des raisons pourquoi je suis contente d'avoir choisie ce laboratoire c'est vous ! Vous êtes rapidement devenus mes très bons amis à qui je pouvais raconter n'importe quoi. Je suis heureuse de passer ces deux années à vos côtés remplies de beaux moments et j'espère de garder cette amitié. **Walid**, tu sais bien comment je te suis reconnaissante pour tout. On a travaillé ensemble sur le projet de neuroblastome et comme on disait : « Team sphéro un jour, team sphéro toujours ». **Manu**, merci d'avoir fait partie avec moi de la team de soir « m & m » dans les hottes de culture cellulaire.

Je tiens également à remercier l'assistant de recherche, **Nicolas Sgarioto**. Ton grande expérience en recherche et tes conseils ont été précieux pour avancer dans mes expériences et m'améliorer. Désolé pour des questions parfois stupides qui pouvaient parfois énerver Alors, de tout mon cœur, ceci est pour toi : #♥♥.

Aussi, je remercie énormément les deux post doctorants de notre laboratoire, **Antoine Méant** et **Anaïs Darracq**, pour votre support continu et votre aide énorme dans mon projet. On a beaucoup discuté de la science et un peu de tous les sujets de la vie quotidienne. Nous avons passé avec chacun d'entre vous qu'une année ensemble dans le laboratoire, mais tous les petits moments passés avec vous sont chers et inoubliables pour moi. Je les garderai dans mon cœur. **Anaïs**, notre laboratoire ne serait pas pareil sans toi. Tu es une personne merveilleuse et exceptionnelle ! Tu as toujours été là pour moi et tu m'as motivé à finir les expériences et à passer à la rédaction de ce mémoire pour avoir un travail de qualité supérieure. Je ne pourrais pas me souvenir de toutes nos blagues tellement elles sont nombreuses. Merci aussi pour tous nos discours plus farfelus les uns que les autres.

Merci à toute ma famille et mes amis et surtout à ma **mère** et ma **grand-mère** pour avoir toujours cru en moi. Je ne sais pas qu'est-ce que je ferais sans tout l'encouragement et l'amour que j'ai eu de votre part tout au long de mes études. Vous êtes un formidable exemple pour moi et mon inspiration quotidienne à faire plus et mieux. J'espère que vous seriez fières de moi !

Les mots ne sont pas suffisants pour exprimer ma reconnaissance envers mon amoureux, **Vadim**. Merci pour tout ton support et aide durant ma maîtrise. Tu comptes beaucoup pour moi et je suis contente de t'avoir dans ma vie. J'ai découvert beaucoup de nouvelles choses avec toi et tant de choses restent à découvrir ! Tous les moments passés avec toi et **Chica** sont inoubliables et me rendent heureuse. Tu sais toujours comment me motiver et me pousser à être la meilleure version de moi-même. Pour moi, tu es l'exemple parfait d'une personne passionnée par son emploi. Par contre, nous deux, on sait bien que derrière ton succès et tous tes projets architecturaux réussis se cache un énorme travail de persévérance. Tu es ma force et ma faiblesse. Merci pour l'amour et la compréhension. Je t'adore !

Je remercie grandement le laboratoire de **Dr. McGraw** et son étudiante au doctorat, **Alexandra Langford** d'avoir aidé avec l'analyse des données de RNA-Seq. Malheureusement, les résultats étaient disponibles plus tard que prévu, difficiles à accéder et ne figurent pas dans ce mémoire, mais j'apprécie le temps et l'attention que t'as accordé à mon projet.

Je tiens à remercier les **professeurs** que j'ai eu dans mes cours de première année qui ont été très utiles dans mon cheminement académique. J'ai appris des nouveaux concepts dans les cours théoriques, ainsi qu'à critiquer les articles et à faire des présentations (par affiche et orale), ce qui m'a aidé dans mon projet de recherche, incluant la rédaction de ce mémoire, et aussi dans les présentations comme la Journée de la recherche Gabriel L. Plaa ou le 36e Congrès des étudiants des cycles supérieurs et des post doctorants en recherche au CHU Sainte-Justine.

Merci également au **département de pharmacologie et physiologie** et à la **Faculté des études supérieures et postdoctorales** de l'Université de Montréal pour la bourse départementale et la bourse de fin d'études qui m'ont été généreusement octroyées.

Vous êtes tous des personnes remarquables et ce mémoire est le reflet de votre appui inconditionnel. Encore une dernière fois, à vous tous un énorme merci !

Introduction

Chapitre 1 – Le neuroblastome

1.1 Historique

Le neuroblastome a été décrit pour la première fois en 1864 par le pathologiste allemand Rudolf Virchow comme une tumeur abdominale de l'enfant appelée « gliome » [1]. La première décennie du XXe siècle a été marquée par la publication des observations cliniques chez les jeunes enfants permettant d'identifier le site primaire de la tumeur, ainsi que les deux sites principaux de métastases [2].

D'abord, en 1901, William Pepper a rapporté six cas de nourrissons, âgés entre 5 jours et 4 mois, morts suite à une hépatomégalie massive due à une atteinte diffuse du foie [2]. Ces patients ont aussi eu des tumeurs au niveau des glandes surrénales, mais sans métastases [2]. D'ailleurs, l'expression « syndrome de Pepper » est encore utilisée de nos jours pour décrire la présentation clinique particulière du neuroblastome chez le nourrisson avec des métastases au foie [2]. En effet, ce syndrome rare est caractérisé par un pronostic favorable et un taux élevé de régression spontanée malgré les métastases [3].

Par la suite, en 1907, Robert Grieve Hutchison a décrit 10 jeunes enfants, âgés entre 9 mois et 8 ans, présentant une tumeur surrénale similaire mais avec des métastases aux os, plus précisément à l'orbite et au crâne [2]. Finalement, James Homer Wright a utilisé le terme « neuroblastome » pour la première fois en 1910 et a identifié l'origine neurale primitive de cette tumeur des glandes surrénales en se basant sur l'histologie [4]. En effet, les cellules en forme de rosettes sont typiquement retrouvées dans plusieurs tumeurs neurales [4].

Tous ces premiers travaux ont grandement contribué à une meilleure compréhension de la pathologie du neuroblastome et ont mené au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour augmenter le taux de survie des enfants avec le neuroblastome.

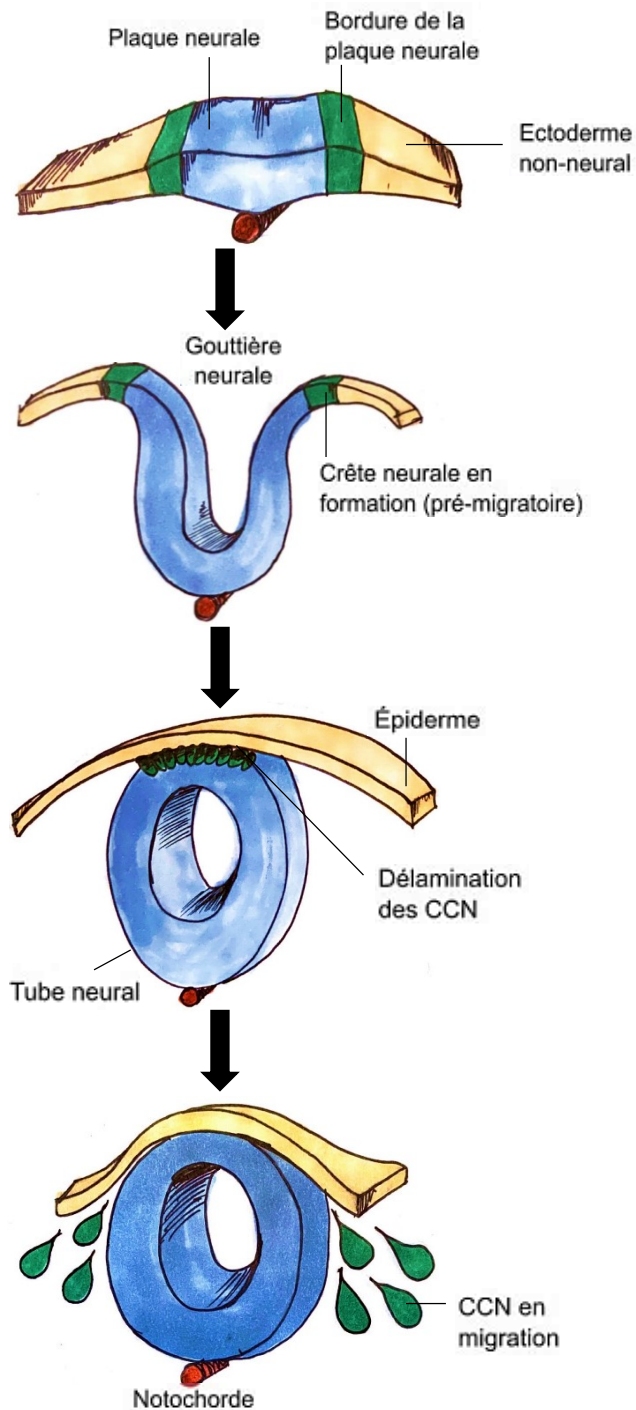
1.2 Origine cellulaire et cause du neuroblastome

L'origine cellulaire et les mécanismes d'initiation du neuroblastome restent encore peu connus [5]. Cependant, comme la tumeur prend naissance au niveau de la glande surrénale ou des ganglions sympathiques, il est probable qu'elle soit causée par le développement anormal des cellules sympatho-surréaliennes issues de la crête neurale (CN) [6]. Cette dérégulation mène aux cellules immatures qui sont ensuite destinées à former le système nerveux sympathique [5].

La CN est formée après l'étape de gastrulation du développement embryonnaire aux frontières entre la plaque neurale (l'ectoderme neural) et l'ectoderme non-neural [7]. Le développement de la CN consiste globalement en une transformation de la plaque neurale en tube neural après une série d'évènements régulés par un réseau de plusieurs gènes (Figure 1) [7]. Durant la neurulation, la plaque neurale se replie d'abord en gouttière neurale, puis les territoires adjacents à la plaque se rapprochent et se referment pour former le tube neural [7].

Les cellules se trouvant à la bordure de la plaque neurale détectent les molécules des voies de signalisation interconnectées WNT, BMP (*bone morphogenetic protein*) et FGF qui participent à l'induction neurale et différencient les cellules de l'ectoderme (Figure 2) [8-11]. Les cellules progénitrices de la CN, nouvellement formées dans la partie dorsale du tube neural, commencent à exprimer les facteurs de transcription de la spécification de la CN (ex : Sox 5/9/10, FoxD3) qui permettent d'initier le processus de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) [7, 12, 13].

Les cellules subissant la TEM commencent à perdre leur propriétés adhésives aux cellules avoisinantes et à acquérir le phénotype mésenchymal afin de finalement, se dissocier du tube neural [14, 15]. Elles représentent une population cellulaire migratrice et transitoire exprimant les facteurs de transcription (ex : Myc, RxrG, Ebf1) et migrent le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon afin de se différencier en plusieurs types cellulaires selon leur niveau axial (le crâne, le tronc, la région sacrée), puis contribuer aux structures anatomiques [7, 16, 17]. Ainsi, ces cellules progénitrices sont multipotentes, mais leur potentiel de différenciation tend à se limiter au fur et à mesure du développement [16]. Les types cellulaires dérivés de la CN incluent les neurones, les cellules gliales, les os et les cartilages, les tissus conjonctifs et les muscles lisses, les cellules de la glande surrénale, les adipocytes et les mélanocytes de la peau [16, 18-22].



Induction de la bordure de la plaque neurale

Spécification de la crête neurale

Migration/Différenciation des cellules de la crête

TEM/Délamination des cellules de la crête neurale

Figure 1 : Processus du développement de la crête neurale.

La crête neurale (vert) est induite aux frontières entre la plaque neurale (bleu) et l'ectoderme non-neural (blanc). Elle se forme suite au repliement de la plaque neurale pour former le tube neural. Les cellules de la crête neurale (CCN) se détachent de la partie dorsale du tube neural pour la migration à travers l'embryon et la différenciation en divers types cellulaires. *Illustration adaptée de [7].*

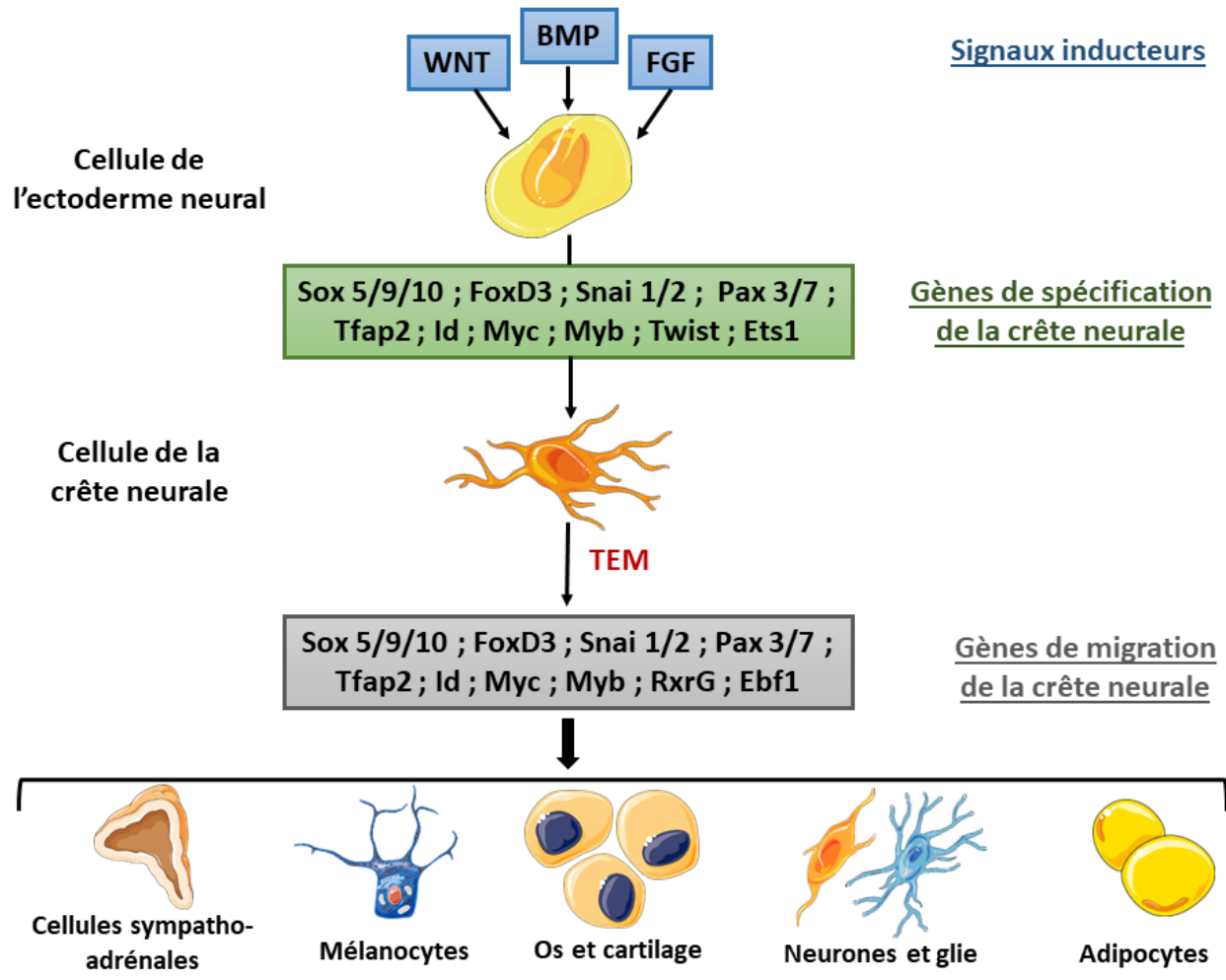


Figure 2 : Réseau de signaux moléculaires intervenant dans la formation de la crête neurale et la spécification des cellules de la crête neurale.

Quelques protéines de la signalisation externe (bleu), sécrétées par l'ectoderme embryonnaire, induisent l'expression des gènes d'identité de la crête neurale (vert) tel que les facteurs de transcription Sox. Une fois la crête neurale spécifiée, le processus de la TEM est activé et les cellules expriment les régulateurs transcriptionnels permettant leur migration, puis leur diversification finale (gris) en une grande variété de types cellulaires. *Illustration adaptée de [7, 23] ; images proviennent de <https://smart.servier.com/>.*

Le neuroblastome semble provenir d'une dérégulation des facteurs impliqués dans le développement de la crête neurale suite à un changement épigénétique et/ou à une mutation génétique [24]. En effet, les altérations jouant un rôle important dans le détachement et la différenciation des cellules de la crête neurale se trouvent au niveau de la modification des histones et de la méthylation de l'ADN, dans l'activation des programmes transcriptionnels et de l'expression des protéines morphogénétiques osseuses (Figure 3) [24, 25].

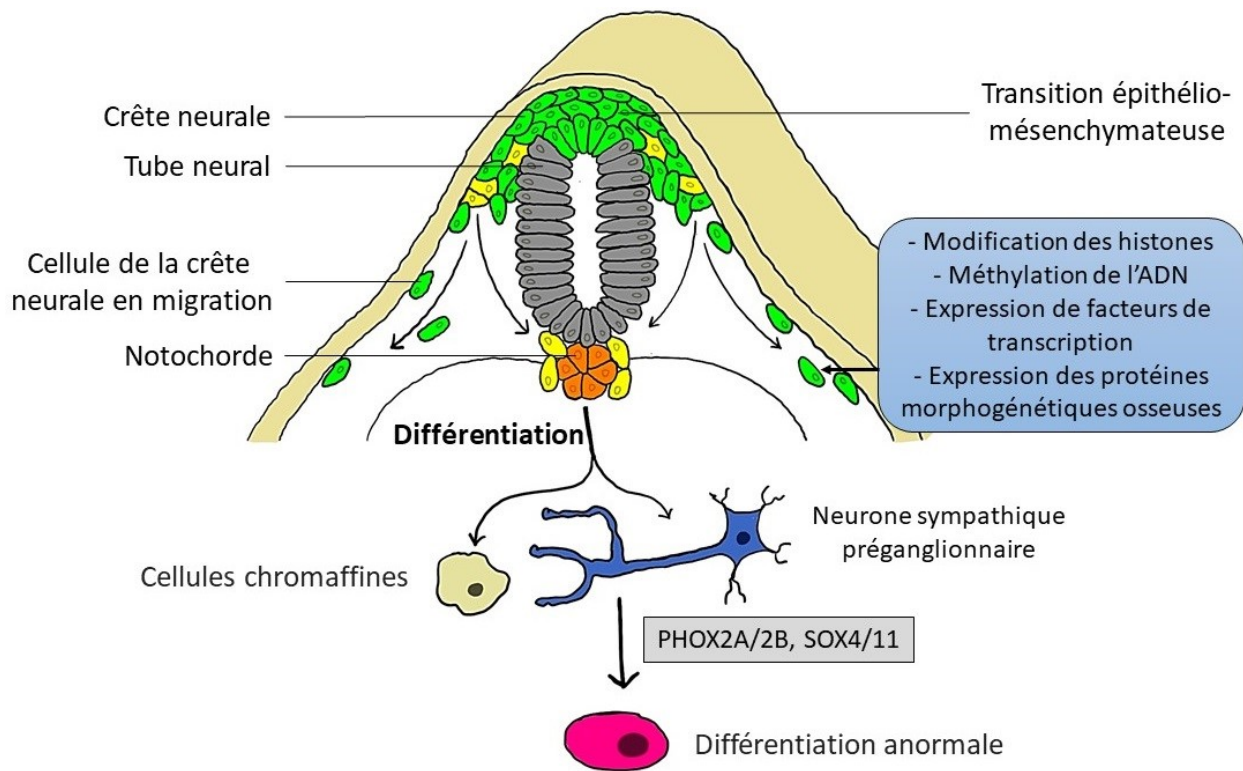


Figure 3 : Évènements et facteurs génétiques influençant la maturation de la crête neurale et l'initiation du développement du neuroblastome.

La spécification des cellules au niveau de l'aorte dorsale est dépendante des modifications des histones et de l'ADN, ainsi que de l'expression de facteurs de transcription ou les protéines morphogénétiques osseuses (BMP). Ces facteurs vont influencer la migration et la différenciation des cellules de la crête neurale. De plus, l'activation de l'expression du facteur de transcription MYCN ou les mutations dans les gènes ALK et PHOX2B favorisent la différenciation anormale et prédisposent au neuroblastome. *Illustration adaptée de [24, 25].*

Dans certains cas, il arrive que les progéniteurs sympatho-surréaliens de la crête neurale, c'est-à-dire les cellules chromaffines surrénales et les neurones sympathiques, n'arrivent pas à se différencier correctement en raison de la surexpression du proto-oncogène *MYCN* ou à cause des mutations/des altérations germinales dans les gènes *ALK* ou *PHOX2B* (Figure 3) [25-29]. Ces derniers sont responsables des rares cas de neuroblastome familial, représentant environ 1-2% des enfants ayant reçu un diagnostic de neuroblastome [24]. Les cellules se retrouvent alors majoritairement à l'état indifférencié, appelé neuroblastes, et ne prolifèrent pas correctement en divers types cellulaires, ce qui conduit au développement du neuroblastome [30].

1.3 Épidémiologie descriptive du neuroblastome pédiatrique

Le neuroblastome est une tumeur solide maligne qui survient le plus souvent à l'extérieur du crâne et du cerveau [31]. C'est le troisième type de cancer de l'enfant (8%), précédé par les leucémies (29%) et les cancers du cerveau (21%) (Figure 4) [32]. Cette tumeur pédiatrique est responsable d'environ 15% des mortalités parmi tous les décès d'enfants dus au cancer [33]. Ces données reflètent la nature agressive du neuroblastome et la présence fréquente (48% des patients) des métastases au moment du diagnostic [34, 35]. Ceci s'explique par le fait que les patients avec la tumeur localisée sont souvent asymptomatiques et le diagnostic du neuroblastome est fait par coïncidence lors d'une consultation pour d'autres raisons médicales [33]. Ainsi, la tumeur réussie à se propager efficacement vers d'autres parties du corps avant le diagnostic du cancer de l'enfant [33].

L'incidence du neuroblastome est autour de 10 cas par million d'enfants âgés en bas de 15 ans et près de 300 nouveaux cas sont rapportés chaque année [31, 36]. Dans plus de 90% des cas, le neuroblastome est diagnostiqué avant l'âge de 5 ans et environ 30% de ces derniers sont diagnostiqués chez le nourrisson de moins d'un an [31]. L'âge médian au diagnostic se situe à 22 mois [34]. Le neuroblastome affecte presque exclusivement les jeunes enfants [36]. Il est très rarement diagnostiqué chez les adolescents ou les adultes et peu de rapports descriptifs sont publiés pour ces groupes d'âge [36]. En effet, seulement 6,1% des patients avec le neuroblastome sont âgés de plus de 20 ans au moment du diagnostic et 0,9% ont plus de 60 ans [37, 38].

Il semble ne pas avoir de variation à travers le monde dans l'incidence du neuroblastome pédiatrique [33]. Par contre, ce cancer affecte légèrement plus les garçons que les filles avec un ratio de 1,2 : 1 [33]. Parmi les facteurs environnementaux associés au développement du neuroblastome se trouvent l'exposition paternelle aux champs électromagnétiques, la consommation fréquente de l'alcool par la mère durant la grossesse ou la prise de médicaments neuroactifs et l'exposition prénatale aux pesticides [33, 39-41]. De plus, le neuroblastome peut affecter un enfant atteint déjà d'une maladie impliquant le développement des cellules de la crête neurale, comme le syndrome d'hypoventilation centrale congénitale, la neurofibromatose de type I ou la maladie de Hirschsprung [42-44]. Cependant, les études sur la prédisposition génétique n'ont pas démontré de lien évident entre le neuroblastome et ces trois troubles [33].

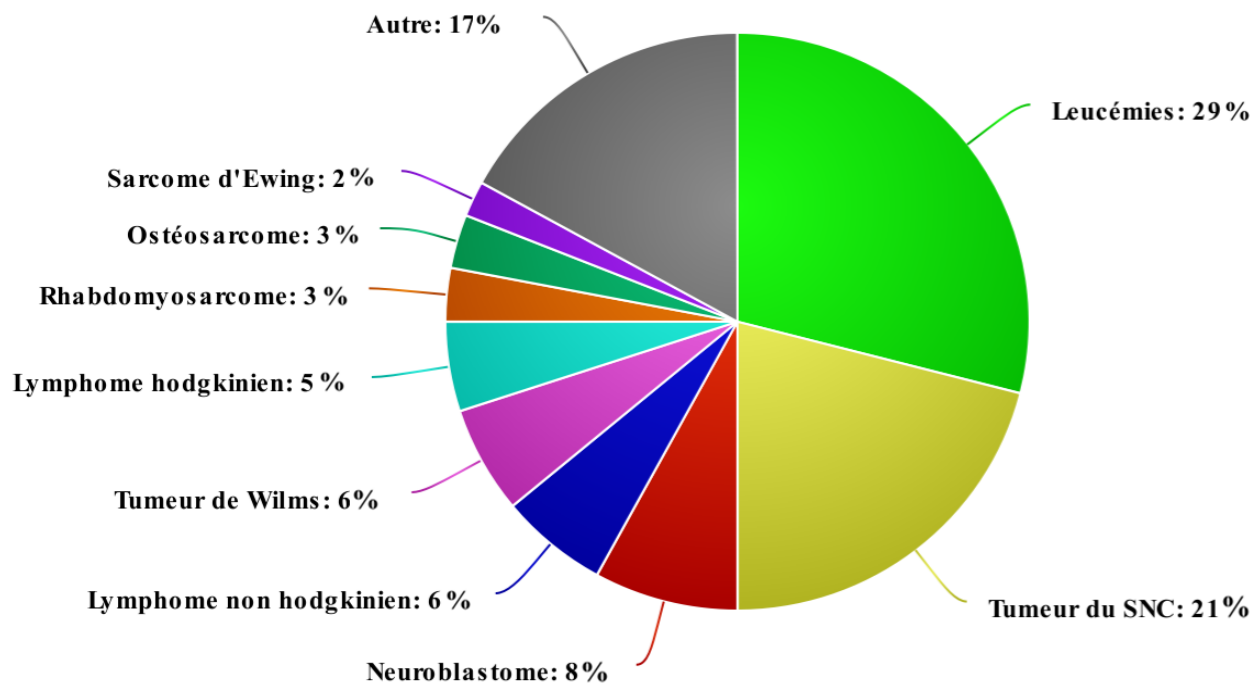


Figure 4 : Incidence des cancers de l'enfant pour le groupe d'âge de 0 à 14 ans.

Les types de cancer retrouvés chez l'enfant sont différents de ceux des adultes : les leucémies (ALL et AML avec les pourcentages respectifs de 25% et de 4%), ainsi que les tumeurs du système nerveux central (SNC) sont les cancers les plus fréquents, suivi par le neuroblastome. *Diagramme adapté de [32].*

1.4 Hétérogénéité clinique

Puisque les cellules de la crête neurale migrent tout le long de la chaîne sympathique, le neuroblastome peut survenir à n'importe quel endroit du système nerveux sympathique du cou jusqu'au bassin [45]. La tumeur primaire se localise le plus souvent au niveau de l'abdomen (65%) dont plus de la moitié des cas proviennent de la médullosurrénale [31]. Des sites primaires moins fréquents incluent le cou (5%), la poitrine (20%) et le bassin (5%) [33]. Très rarement (pour ~1% des patients), le site de la tumeur primaire n'est pas détecté [33].

La propagation du neuroblastome pédiatrique à des sites distants passe par les voies hématogène et/ou lymphatique [31]. Ainsi, parmi les sites métastatiques du cancer se trouvent le foie, la moelle osseuse et l'os avec une préférence pour la métaphyse, le crâne et l'orbite [33]. Contrairement aux patients avec une tumeur localisée qui ne présentent pas des symptômes évidents, le neuroblastome disséminé se manifeste par la fièvre, la lymphadénopathie, la perte de poids, les douleurs osseuses généralisées ou abdominales et les problèmes respiratoires à cause de l'hépatomégalie massive [31].

Les nodules sous-cutanés de couleur bleue-violette, connus comme le syndrome *blueberry muffin*, se présentent lors des métastases à la peau [31]. Il survient à cause de l'hématopoïèse dermique et est associé au pronostic favorable avec la possibilité de régression spontanée de la tumeur [31]. Puis, la présentation classique de la dissémination tumorale aux orbites est les gonflements et les ecchymoses autour des yeux, ressemblant à « un raton laveur » [33].

Le neuroblastome est un cancer unique caractérisé par une grande hétérogénéité clinique allant de la régression spontanée sans la chimiothérapie (ou la différenciation en ganglioneurome bénin) à la progression rapide d'une tumeur résistante à la thérapie multimodale, les métastases et l'issue létale du patient [45-50]. Le mécanisme exact de la régression spontanée n'est pas connu, mais quelques études ont tenté d'expliquer cette particularité du neuroblastome pédiatrique rarement retrouvée dans d'autres types de cancers. En effet, parmi les mécanismes possibles se trouvent : 1) le manque des récepteurs neurotrophines TRKA (récepteur kinase à tropomyosine A) dans le microenvironnement tumoral ; 2) l'immunité cellulaire ou humorale ; 3) la perte de l'activité de la télomérase et 4) les altérations de la régulation épigénétique [46-51].

En effet, les changements épigénétiques, telles que le remodelage de la chromatine, la méthylation des promoteurs de gènes ou les modifications des histones semblent être impliquées dans la régression spontanée du cancer puisqu'ils influencent l'expression des gènes associés à la différenciation et au développement du neuroblastome [52-57]. Une différence au niveau du méthylome (la méthylation de l'ADN globale) de neuroblastome de stade 4S a été observé en comparaison avec les tumeurs à faible risque, à haut risque et les tissus cérébraux normaux [58].

Les tumeurs de neuroblastome cliniquement agressives possèdent fréquemment une hyperméthylation des promoteurs de trois gènes distincts *RASSF1A*, *DCR2* et *CASP8* [57, 59]. Cette méthylation aberrante se produit dans ~60%-90% des tumeurs primaires du neuroblastome pour *RASSF1A*, dans ~20%-40% pour *DCR2* et dans ~20%-60% pour *CASP8* et est associée à un mauvais pronostic [57, 60, 61]. En effet, la survie à 5 ans lorsque les gènes *RASSF1A*, *DCR2* et *CASP8* sont méthylés est de 63%, 58% et 56% respectivement et elle est de 93%, 85% et 84% respectivement lorsque ces gènes sont non méthylés [62].

RASSF1A (*Ras Association Domain Family Protein 1 isoform A*) est un effecteur Ras qui agit par la voie de transduction du signal Ras [62]. C'est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la stabilité génomique, la stabilisation des microtubules et la motilité cellulaire [63]. L'hyperméthylation du promoteur de *RASSF1A* altère son expression et est associée aux tumeurs pédiatriques, ainsi qu'aux cancers du sein, de l'ovaire et du rein [64-66].

DCR2 (*decoy receptor 2*) est un gène de la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) possédant une activité anti-apoptotique, car il empêche la liaison du ligand TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) aux récepteurs apoptotiques de mort, DR4 et DR5 [60]. Théoriquement, la régulation négative du gène *DCR2* doit avoir l'effet anti-tumoral et rendre les cellules plus sensibles à l'apoptose induite par TRAIL [67]. Par contre, ce gène est souvent inactivé par l'hyperméthylation aberrante dans divers tumeurs et constitue donc possiblement, un mécanisme de défense inefficace pour inhiber la croissance des cellules tumorales [67, 68].

Le gène *CASP8* code pour la caspase 8, un membre de la famille des protéases à cystéine ayant un rôle clé dans l'apoptose [62]. La perte d'expression de *CASP8* par méthylation favorise la survie cellulaire dans le microenvironnement stromal et les métastases [69].

1.5 Facteurs pronostiques et groupes de risque

Le groupe d'oncologie pédiatrique (COG, *Children's Oncology Group*) a créé une échelle qui permet de classer les patients dans un des trois groupes de risque (faible, intermédiaire ou élevé) en fonction des : 1) données cliniques du patient (l'âge au moment du diagnostic ; le stade INSS (*International Neuroblastoma Staging System*) de la tumeur), ainsi que 2) données sur la tumeur (la classification histopathologique ; le statut de l'oncogène *MYCN* ; la ploïdie (le contenu en ADN)) [70, 71]. Ce système de stratification, établi en 1998, révèle les différences dans les taux de survie des différents groupes de risque et permet d'adapter adéquatement l'intensité, ainsi que le type de traitement en fonction du groupe du patient [70].

1.5.1 Âge du patient au moment du diagnostic

Les enfants âgés de plus de 18 mois au moment du diagnostic présentent fréquemment des métastases et malgré l'approche thérapeutique multimodale et intensive ont des taux de survie ne dépassant pas 40-50% [70, 72]. Au contraire, les enfants de moins de 18 mois peuvent guérir suite à un traitement de chimiothérapie, puis une grande partie des patients ont souvent une régression spontanée et complète de la tumeur (même des formes métastatiques) [46-50].

1.5.2 Histopathologie tumorale

Un patient avec une tumeur différenciée a généralement un pronostic plus favorable et un meilleur taux de survie qu'un patient avec une tumeur faiblement ou indifférenciée [73]. Le neuroblastome indifférencié se présente sous forme des petites cellules bleues rondes avec le rapport nucléaire-cytoplasmique élevé et un manque des neurites [74]. Le neuroblastome faiblement différencié ressemble au neuroblastome indifférencié, mais il est caractérisé par la présence des extensions des neurites (figure 5) [74]. Le neuroblastome différenciant présente l'apparence proche des cellules normales (cytoplasme, noyau, neuropile abondant) et contient au moins 5% des cellules tumorales montrant une différenciation vers les cellules ganglionnaires (neuroblastes différenciés) [74].

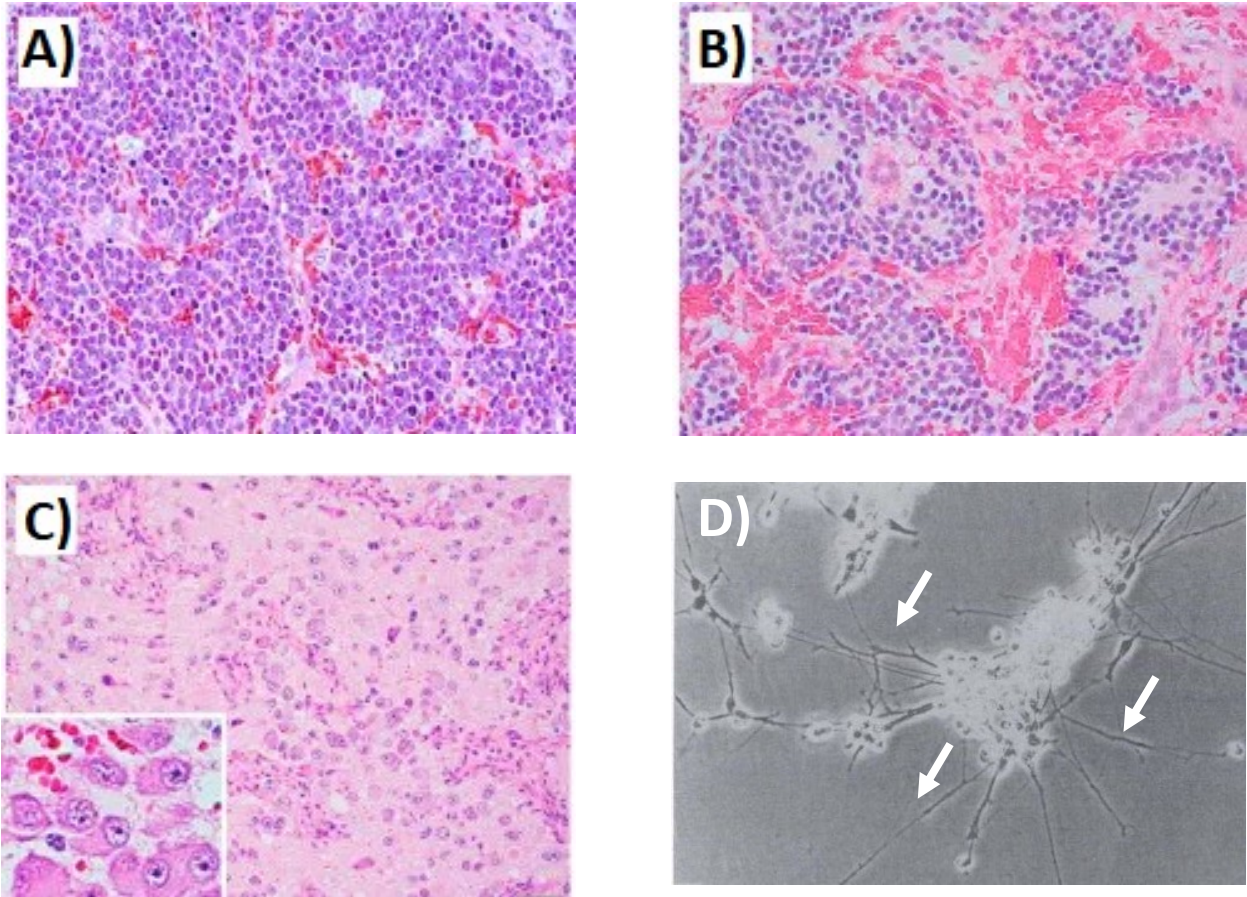


Figure 5 : Principaux sous-types histopathologiques des tumeurs neuroblastiques.

A) Neuroblastome indifférencié ; B) Neuroblastome faiblement différencié ; C) Neuroblastome différenciant ; D) Extensions des neurites pour la lignée de neuroblastome IMR-32 (indiquées par les flèches). *Images adaptées de [33, 75, 76].*

1.5.3 Statut de l'amplification de l'oncogène *MYCN*

L'amplification du gène *MYCN* est le marqueur principal de la progression agressive du neuroblastome indépendamment de l'âge du patient et du stade clinique de cancer [77, 78]. Le groupe de COG subdivise le nombre de copies de *MYCN* en 3 catégories : *MYCN* de type sauvage (l'augmentation de moins de 2 fois du signal *MYCN* par rapport à la sonde de référence) ; le gain de *MYCN* (l'augmentation de 2-4 fois) et l'amplification de *MYCN* (l'augmentation de plus de 4 fois) [79]. Les patients des deux derniers groupes possèdent des caractéristiques cliniques et biologiques défavorables et des taux de survie sont faibles en comparaison aux patients avec une tumeur *MYCN* non amplifiée [80].

1.5.4 Ploïdie des cellules tumorales

Les cellules non cancéreuses sont diploïdes (index d'ADN = 1). Un lien semble exister entre l'amplification du gène *MYCN* et la ploïdie : pour le neuroblastome *MYCN* non amplifié de stade avancé, la tumeur hyperdiploïde (index d'ADN > 1) a un meilleur pronostic et répond mieux au traitement standard avec le cyclophosphamide et la doxorubicine que la tumeur diploïde [81-83].

1.5.5 Taux de survie en fonction du groupe de risque selon COG

La classification mise en place par le groupe COG révèle bien l'hétérogénéité clinique du neuroblastome pédiatrique qui se manifeste dans les courbes de survie : les survies se trouvent à plus de 90% pour les patients diagnostiqués avec le neuroblastome à risque faible, à plus de 80% pour ceux à risque intermédiaire et autour de 30-40% pour ceux à risque élevé (Figure 6) [84-87]. Malgré les progrès significatifs dans le traitement de neuroblastome à risque élevé, il constitue le principal groupe qui requière le développement des nouvelles approches thérapeutiques afin d'améliorer le pronostic et la survie des patients dans ce groupe.

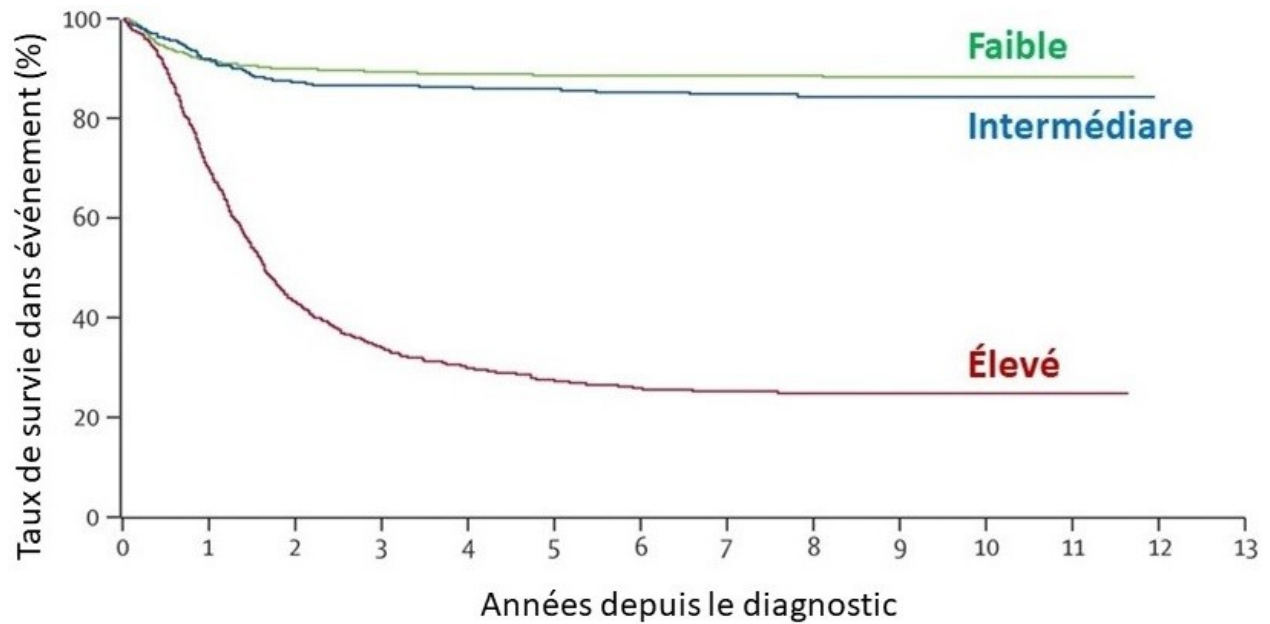


Figure 6 : Courbes de survie des patients atteints de neuroblastome selon le groupe de risque.

Entre les années 1986-2001, 2196 patients traités selon les protocoles des trois groupes d'études (*Children's Oncology Group, Children's Cancer Group, Pediatric Oncology Group*) ont été classés au moment du diagnostic comme étant à faible risque (vert ; n = 916) ou à risque intermédiaire (bleu ; n = 431) ou à risque élevé (rouge ; n = 849) en se basant sur différentes caractéristiques cliniques et biologiques. L'analyse de Kaplan-Meier montre des taux de survie variant d'un groupe à l'autre. Les patients avec le neuroblastome à risque élevé ont le plus mauvais taux de survie. *Graphique adapté de [70].*

1.6. Classification du neuroblastome

Le système de stadification du neuroblastome INSS (*International Neuroblastoma Staging System*), établi en 1988 et révisé en 1993, permet la division des tumeurs de neuroblastome en différents stades en fonction de la localisation de la tumeur primaire, la présence de métastases lors du diagnostic et leur emplacement (Tableau I) [88]. C'est un système post-chirurgical [88].

Tableau I : Stades du neuroblastome selon la classification du système postopératoire INSS.

Stade	Description
1	Tumeur localisée, exérèse macroscopiquement complète, avec ou sans résidus microscopiques. Ganglions lymphatiques ipsilatéraux sont négatifs pour la tumeur au microscope. (Ganglions attachés et enlevés avec la tumeur peuvent être positifs).
2A	Tumeur localisée, exérèse macroscopiquement incomplète. Ganglions lymphatiques ipsilatéraux sont négatifs pour la tumeur au microscope.
2B	Tumeur unilatérale avec ou sans exérèse macroscopiquement complète. Ganglions lymphatiques ipsilatéraux envahis. Ganglions controlatéraux doivent être négatifs au microscope.
3	Tumeur unilatérale non résécable dépassant la ligne médiane avec ou sans envahissement ganglionnaire régional ou tumeur localisée unilatérale avec ganglions lymphatiques controlatéraux envahis ou tumeur dépassant la ligne médiane avec extension bilatérale (non résécable) ou ganglions lymphatiques envahis.
4	Toutes tumeurs primaires avec dissémination métastatique aux os, au foie, à la peau, à la moelle osseuse, aux ganglions lymphatiques distants et/ou à d'autres organes (à l'exception de ceux définis au stade 4S).
4S	Tumeur primaire localisée (comme défini pour les stades 1, 2A ou 2B) avec une dissémination métastatique limitée à la peau, au foie et/ou à la moelle osseuse (<10% de la tumeur) chez les enfants âgés de moins d'un an.

Tableau adapté de [88].

Le système de classification de la pathologie du neuroblastome INPC (*International Neuroblastoma Pathology Classification*) a été développée en 1999 et révisée en 2003 par l'adoption du système de classification original proposé par Shimada en 1984 avec quelques modifications mineures (Tableau II) [89, 90]. L'objectif principal du système INPC était d'établir le système de classification pronostiquement significatif, biologiquement pertinent, mais aussi hautement reproductible en se basant sur différentes caractéristiques morphologiques des tumeurs [90]. De plus, les recommandations pour les pathologistes chirurgicaux ont été décrites afin de les aider dans la description et l'évaluation pronostique des tumeurs neuroblastiques [90].

L'INPC distingue les tumeurs neuroblastiques (le neuroblastome, le ganglioneurome et le ganglioneuroblastome) en deux catégories (l'histologie favorable ou non favorable) en fonction du développement du stroma Schwannien, l'âge du patient, le degré de différenciation tumoral et l'index mitose-caryorrhexie (MKI, *mitosis-karyorrhexis index*) [90, 91]. Le neuroblastome est une tumeur neuroblastique avec un stroma Schwannien pauvre (proportion de tissu tumoral avec l'histologie riche en stroma ne dépassant pas 50%), alors que les deux autres types de tumeur neuroblastique possèdent un stroma développé ($\geq 50\%$ du tissu tumoral) [74]. Un MKI élevé dans la tumeur pauvre en stroma est associé à la prolifération tumorale et au mauvais pronostic [92].

Tableau II : Évaluation pronostique du neuroblastome selon la classification INPC.

Âge	Différenciation	MKI	Catégorie pronostique
< 1,5 ans	Non différencié	Tout MKI	Histologie non favorable
	Faiblement différencié/différencié	Faible/moyen	Histologie favorable
	N'importe quel type de différenciation	Élevé	Histologie non favorable
1,5 – 5 ans	Non différencié/faiblement différencié	Tout MKI	Histologie non favorable
	Différencié	Faible	Histologie favorable
	N'importe quel type de différenciation	Moyen/élevé	Histologie non favorable
≥ 5 ans	N'importe quel type de différenciation	Tout MKI	Histologie non favorable

Tableau adapté de [90].

Finalement, le plus récent système de stadification INRGSS (*International Neuroblastoma Risk Group Staging System*), publié en 2009, a été conçu pour le diagnostic de la tumeur avant l'intervention chirurgicale ou tout autre traitement (Tableau III) [93]. Alors que l'ancien système de classification INSS se base sur la pathologie chirurgicale et la résection tumorale, le nouveau système INRGSS permet une meilleure classification des patients d'après les critères cliniques et les facteurs de risque définis par l'imagerie (IDRF, *image-defined risk factors*) lors des examens d'imagerie [94]. Les méthodes d'imagerie utilisées incluent la tomodensitométrie, l'imagerie par résonance magnétique, la scintigraphie et l'ultrasonographie [93].

Les tumeurs localisées sont classées comme étant de stade L1 ou L2 dépendamment si des facteurs de risque IDRF sont présents ou non au moment du diagnostic [93]. Les IDRF sont 20 facteurs chirurgicaux qui rendent l'ablation totale de la tumeur risquée ou difficile [95, 96]. Les stades M et MS sont associés au cancer métastatique : le stade M est comparable au stade 4 de l'INSS et le stade MS est similaire au stade 4S de l'INSS (à l'exception de la taille de la tumeur primaire et l'âge du patient) [90, 93]. Le nouveau système INRGSS n'était pas créé pour remplacer le système INSS et il est plutôt recommandé d'utiliser ces deux systèmes en parallèle [93, 94].

Tableau III : Stades du neuroblastome selon la classification du système préopératoire INRGSS.

Stade	Description
L1	Tumeur localisée n'impliquant pas d'organes vitaux et confinée à une seule région, sans les facteurs de risque IDRF
L2	Tumeur locorégionale avec un ou plusieurs facteur(s) de risque IDRF
M	Tumeur métastatique (excepté le stade MS)
MS	Tumeur métastatique chez l'enfant âgé de moins de 18 mois avec les métastases à la peau, au foie et/ou à la moelle osseuse

Abbréviation : IDRF : image-defined risk factors. *Tableau adapté de [93].*

1.7 Thérapie multimodale du neuroblastome

Le neuroblastome est un cancer pédiatrique de spectre extrêmement variable sur le plan clinique : la tumeur peut régresser spontanément sans traitement ou au contraire, se propager à travers le corps [45]. Le type de traitement et son intensité sont choisis en fonction du groupe de risque de patient (Figure 7) [97]. En effet, la thérapie est adaptée pour éviter l'exposition inutile de jeunes patients aux traitements avec des effets secondaires, comme la chimiothérapie qui agit indifféremment sur toutes les cellules en division peu importe qu'elles soient cancéreuses ou normales [98]. Ainsi, la chimiothérapie est appliquée aux patients avec une tumeur localisée ou de stade avancé et la radiothérapie est réservée aux patients avec une tumeur biologiquement défavorable [33]. Les caractéristiques génétiques et histologiques du tissu tumoral sont souvent évaluées suite à une biopsie chirurgicale [33].

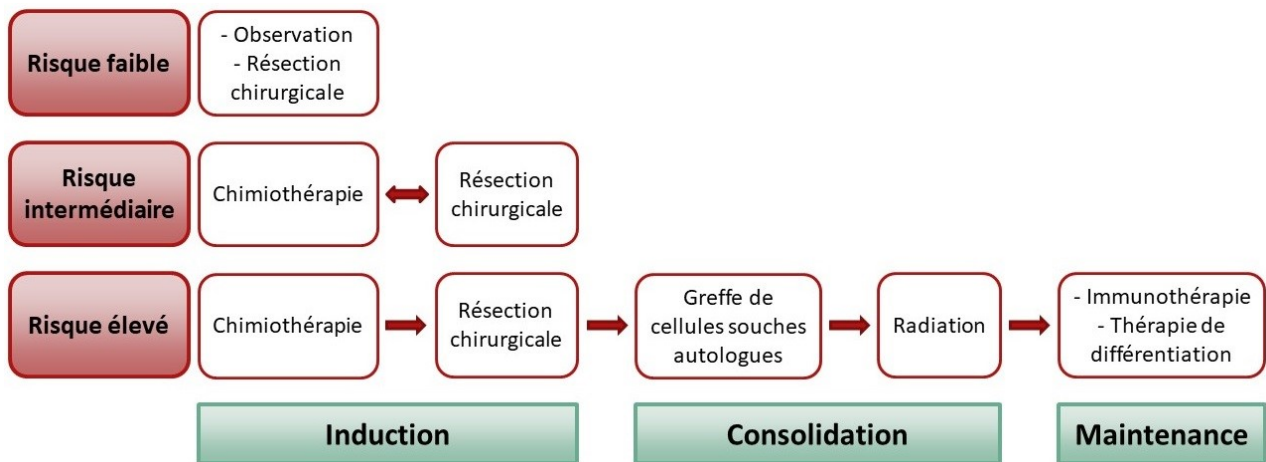


Figure 7 : Comparaison des thérapies du neuroblastome en fonction du groupe de risque.

Les patients avec le neuroblastome à risque faible sont mis en observation sans traitement. Si la tumeur progresse, elle est enlevée par la chirurgie. Le neuroblastome à risque intermédiaire est traité par des doses modérées de chimiothérapie ajustées en fonction de la réponse du patient, puis dès que possible, l'excision de la tumeur primaire. Le neuroblastome à risque élevé nécessite plusieurs cycles de chimiothérapie, la chirurgie, la greffe de cellules souches hématopoïétiques autologues myéloablatives, la radiothérapie locale et enfin, l'immunothérapie avec la thérapie de différenciation. *Schéma adapté de [97].*

1.7.1 Traitement du neuroblastome de risque faible

Les taux de guérison et de survie sont excellents pour les patients à faible risque (stade 1 d'INSS) avec seulement l'intervention chirurgicale [33]. La chimiothérapie constitue la thérapie de sauvetage pour les patients de stade 1 d'INSS en rechute du neuroblastome après la chirurgie [99, 100]. La chimiothérapie (ou la radiothérapie à faible dose) est aussi prévue pour les patients avec un cancer progressif, une tumeur volumineuse et des symptômes qui mettent en danger d'autres organes, comme l'insuffisance respiratoire ou le dysfonctionnement du foie à cause de l'hépatomégalie massive [49, 101]. Selon des études, les taux de survie, de progression et de récurrences du neuroblastome chez les patients traités par la chirurgie seule ou par une combinaison de chirurgie couplée à la chimiothérapie n'étaient pas significativement différents [102, 103].

Généralement, la chimiothérapie n'est pas nécessaire pour les patients avec une tumeur localisée et biologiquement favorable mais pas complètement enlevée par la chirurgie (stades 2A, 2B d'INSS) et la tumeur peut être simplement observée [99, 104, 105]. Le suivi se fait initialement à tous les 1,5 mois avec les examens physiques, l'imagerie médicale (IRM ou échographie) et les catécholamines dans l'urine [97]. Après 3 mois, la surveillance peut être faite à tous les trois mois pendant la première année et par la suite, à tous les six mois [97]. Il a été observé que parmi les patients atteints de neuroblastome de stade 2B, la survie est significativement plus faible pour ceux ayant une tumeur diploïde ou une histologie défavorable et ceux âgés de plus de 18 mois au moment du diagnostic [103].

Pour la majorité des patients avec le stade 4S d'INSS et les caractéristiques biologiques favorables (tumeur hyperdiploïde, sans l'amplification de l'oncogène *MYCN*, sans les anomalies chromosomiques), l'observation seule constitue l'approche thérapeutique appropriée, car la tumeur a tendance à la régression spontanée sans aucun traitement [103, 106]. La résection tumorale peut mener à des complications chirurgicales non envisageables pour les jeunes enfants [97]. Les patients présentant des symptômes liés à la tumeur ou des facteurs de risque IDRF et ayant une biologie tumorale défavorable nécessitent une chimiothérapie et/ou une chirurgie pour réduire le volume de la tumeur [97]. Finalement, les patients avec une tumeur *MYCN* amplifiée doivent être traités comme les patients avec le neuroblastome à haut risque [106].

1.7.2 Traitement du neuroblastome de risque intermédiaire

Le neuroblastome de risque intermédiaire comprend des patients atteints de tumeur de stade L2 histologiquement ou génétiquement défavorables ou de stade MS avec la biologie défavorable ou de stade M (âgés de moins de 18 mois) [97]. Le traitement est constitué de 2 à 8 cycles de chimiothérapie (étoposide, vincristine, carboplatine, doxorubicine, cyclophosphamide) dépendamment de la réponse du patient [97]. Cette chimiothérapie à dose modérée est moins intensive que celle prescrite aux patients avec le neuroblastome de risque élevé [97]. Après les cycles de chimiothérapie espacés de plusieurs jours à quelques semaines, la tumeur primaire est le plus complètement possible enlevée par la chirurgie, mais pour certains patients la résection complète n'est pas nécessaire [107-110].

Le protocole thérapeutique a été adapté par les groupes internationaux pour réduire la toxicité à long terme causée par la chimiothérapie tout en maintenant un taux de survie élevé : l'exposition cumulative à la chimiothérapie (le nombre de cycles) a été réduite et adaptée selon le patient, puis le carboplatine a été remplacé par le cisplatine [33]. Pour les patients avec la tumeur localisée avec les caractéristiques biologiques favorables, la chimiothérapie pourrait être négligée [111]. Par contre, les patients âgés de plus de 1,5 an avec la tumeur de stade L2 dont la résection chirurgicale n'est pas possible et possédant une moins bonne survie, nécessitent une thérapie plus intense, incluant la radiothérapie et le traitement de maintenance [107-109, 112].

1.7.3 Traitement du neuroblastome de risque élevé

Le groupe de risque élevé est composé de patients avec la tumeur de stade M de plus de 18 mois au moment du diagnostic et de patients de n'importe quel âge et stade avec l'oncogène *MYCN* amplifié [97]. Les patients de stade L2 de plus de 18 mois avec la tumeur histologiquement défavorable font aussi partie du neuroblastome à haut risque, mais la thérapie myéloablative n'est pas bénéfique pour ce groupe [113, 114]. Une thérapie multimodale intensive, comprenant la chimiothérapie avec la thérapie ciblée, constitue le traitement standard pour le risque élevé et inclut essentiellement 3 phases : l'induction, la consolidation et la maintenance (Figure 7) [97].

1.7.3.1 Phase d'induction

La phase d'induction commence par deux cycles de chimiothérapie afin de réduire le volume tumoral et d'éliminer les métastases pour ensuite enlever plus facilement la tumeur primaire par la chirurgie [97]. Par contre, parfois, la tumeur peut s'étendre sur des vaisseaux sanguins importants, ce qui rendra sa résection chirurgicale complète difficile et dangereuse [97]. La chimiothérapie d'induction standard comprend généralement une combinaison des agents alkylants, des anthracyclines, de composé de platine et d'inhibiteurs de la topoisomérase II [33].

Une meilleure réponse après l'induction est obtenue par l'augmentation de l'intensité de la chimiothérapie [115]. De plus, un lien direct existe entre la réponse du patient au traitement d'induction et le taux de survie, signifiant que la réponse tumorale constitue un des facteurs pronostiques [116-119]. Si la réponse du patient n'est pas complète avant la greffe de cellules souches, d'autres approches thérapeutiques sont employées : 1) la chimiothérapie additionnelle (par exemple, l'irinotécan et le témozolomide) combinée ou non à l'immunothérapie ou 2) la radiothérapie avec ¹³¹I-MIBG (*iodine-131-metaiodobenzylguanidine*) [120-122].

À la fin de la chimiothérapie, la tumeur primaire et les sites métastatiques volumineux, si existants, sont enlevés le plus entièrement possible par la chirurgie [97]. La résection chirurgicale n'est pas avantageuse pour la survie des patients avec un cancer métastatique, mais corrèle avec un meilleur pronostic des patients avec la tumeur de stade L2 à haut risque [112, 114, 123-126]. En effet, il y a toujours un risque de complications secondaires à l'intervention chirurgicale telles que l'hémorragie menant aux lésions intestinales et des nausées, des vomissements, une diarrhée ou encore, des problèmes au niveau de rein à cause de l'emplacement de la tumeur près de la vascularisation rénale [97]. Ces complications peuvent potentiellement causer du retard entre les cycles de chimiothérapie ou pour effectuer la greffe de cellules souches, ce qui augmente les chances de récurrences pendant la thérapie [97]. De plus, le neuroblastome étant une tumeur solide radiosensible, la radiothérapie administrée au site de la tumeur primaire semble diminuer le risque de récurrence locale et ce, peu importe la réponse à la chimiothérapie [127, 128].

1.7.3.2 Phase de consolidation

La phase de consolidation inclut un ou deux cycles de la thérapie myéloablative avec la greffe de cellules souches autologues, puis la radiothérapie [97]. Plusieurs études cliniques ont démontré l'efficacité de la thérapie de consolidation myéloablative et l'amélioration significative du cancer en comparant avec la chimiothérapie de maintenance ou l'observation [117, 129, 130]. Pour la greffe de cellules souches autologues, les cellules souches du sang périphérique sont collectées chez les patients soit après deux cycles de chimiothérapie ou après le traitement de chimiothérapie d'induction pour diminuer les chances de contamination des cellules tumorales [72, 131]. L'élimination des populations de cellules tumorales de neuroblastome résiduelles avant la greffe de cellules souches par la chimiothérapie à forte intensité ou par l'irradiation corporelle totale n'est plus utilisée, puisque cette étape n'a pas montré d'effet significativement bénéfique pour la survie des patients [72, 132].

La société d'oncologie SIOPEN (*International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma*) a comparé la greffe unique avec la chimiothérapie à haute dose avec le carboplatine, l'étoposide et le melphalan (CEM) (n = 302) à la greffe avec le busulfan et le melphalan (BuMel) (n = 296), tandis que le groupe COG a comparé la greffe en tandem avec du thiotépa et du cyclophosphamide, suivie 1,5 mois plus tard par la combinaison CEM à dose réduite (n = 176) à la greffe unique CEM (n = 179) [85]. La greffe BuMel et en tandem fonctionnent mieux que la greffe CEM seule avec le taux de survie sans évènements à 3 ans de 50% vs 38% (BuMel vs CEM seule) et de 62% vs 48% (greffe en tandem vs CEM seule) ; ainsi, la greffe BuMel et en tandem sont maintenant utilisées comme traitement standard [85, 133-135].

1.7.3.3 Phase de maintenance

Le traitement de maintenance comprend la combinaison de l'isotrétinoïne (connu comme acide 13-cis-rétinoïque) et l'immunothérapie avec l'anticorps anti-GD2 (disialoganglioside) [136]. L'isotrétinoïne est un rétinoïde synthétique qui induit la différenciation et la maturation des cellules de neuroblastome, mais diminue aussi la croissance et la prolifération cancéreuses et améliore la survie sans évènements des patients [117].

Malgré l'efficacité de l'agent différenciant, les anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes spécifiques du neuroblastome GD2 avec les composés immunostimulants, le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) et l'IL-2 (*interleukin-2*), constituent un autre mécanisme d'élimination des cellules cancéreuses résiduelles [136]. L'anticorps monoclonal qui cible le GD2, connu aussi comme le dinutuximab, est la première thérapie approuvée par la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2015 spécifiquement pour les patients avec le neuroblastome à haut risque [137]. Lorsque le dinutuximab reconnaît l'antigène GD2 sur la surface des cellules tumorales, les cellules du système immunitaire vont lyser les cellules cibles [136]. Le GM-CSF et l'IL-2 contribuent à renforcer l'effet anti-tumoral : l'IL-2 stimule les cellules NK (*Natural Killer*) et le GM-CSF active la cytotoxicité des granulocytes et des macrophages [136].

La thérapie de différenciation combinée à l'immunothérapie est appliquée en tant que la principale thérapie de maintenance, car cette combinaison augmente significativement la survie globale (63%) en comparant avec l'isotrétinoïne seul (46%) et diminue le risque de récurrence, si associée à la chimiothérapie ou des infusions des cellules NK [136, 138, 139]. Parmi les effets indésirables les plus observés dans les essais cliniques sur le dinutuximab se trouvent la fièvre, les infections, les réactions allergiques, l'hypotension artérielle, mais aussi la douleur, puisque le GD2 est exprimé sur les neurones et les fibres nerveuses sensorielles périphériques [136]. La thérapie myéloblastive et l'immunothérapie ont grandement contribué à l'amélioration de la survie globale à 5 ans du neuroblastome à haut risque, passant de 29% pour les patients diagnostiqués entre 1990 et 1994 à 50% pour les patients diagnostiqués entre 2005 et 2010 [140].

1.7.4 Traitement du neuroblastome réfractaire ou récidivant

Malgré les avancés dans le traitement des patients atteints de neuroblastome réfractaire ou récidivant qui offre déjà une bonne réponse partielle (ou complète) et améliore les symptômes et la qualité de vie des patients, le neuroblastome réfractaire possède un mauvais pronostic et nécessite des nouvelles approches thérapeutiques [97]. Les combinaisons de chimiothérapie les plus couramment employées pour ce groupe sont : 1) l'irinotécan avec le témozolomide ; 2) le topotécan avec le cyclophosphamide ou le témozolomide [122, 141-143].

Chapitre 2 – Rôle de la génétique dans le neuroblastome

2.1 Altération génétiques

Les avancées significatives dans la compréhension des événements génétiques impliqués dans l'initiation et la pathogenèse du neuroblastome familial ou sporadique (non familial) ont été réalisées grâce aux études GWAS (*genome-wide association studies*), le séquençage du génome, la transcriptomique et l'analyse du génome à haut débit [144]. Plusieurs aberrations génétiques/génomiques font objet d'essais cliniques en tant que des cibles thérapeutiques potentielles qui pourraient avoir une meilleure efficacité et une toxicité réduite par rapport aux traitements déjà existants en clinique [144].

Il existe aussi une problématique concernant les médicaments oncologiques (et encore davantage s'ils sont pour l'usage pédiatrique) : ils ont la plus faible probabilité d'approbation en phase I (6,7%) en comparaison aux composés utilisés pour traiter d'autres maladies, comme les allergies, l'urologie, la dermatologie, les maladie auto-immunes [145]. De plus, les traitements approuvés pour le neuroblastome possèdent généralement une spécificité limitée [45].

Récemment, l'étude de 240 tumeurs provenant des patients âgés de plus de 18 mois au moment du diagnostic avec un cancer métastatique (stade 4) dans le cadre de l'initiative TARGET (*Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments*) a permis d'identifier les mutations somatiques dans le neuroblastome à haut risque [146]. En utilisant une combinaison de séquençage de l'exome entier (*WES, whole exome sequencing*), du génome (*WGS, whole genome sequencing*) et du transcriptome, une faible fréquence médiane de mutation des exons de seulement 0,6 mutations par Mb (Mégabase) a été rapportée et très peu de gènes sont mutés de manière récurrente [146]. La ploïdie des cellules tumorales, les aberrations chromosomiques (incluant les anomalies segmentaires et numériques) et l'amplification de gènes, en particulier du locus du gène *MYCN* sont plus couramment retrouvées [146]. De plus, il est intéressant de noter que le neuroblastome pédiatrique contient nettement moins de mutations que les tumeurs solides adultes, dont les cancers dépendants de l'environnement, comme le cancer du poumon à cellules squameuses, le myélome, l'adénocarcinome pulmonaire et le cancer du sein [147-150].

Suite aux études de séquençage, en plus de l'amplification de l'oncogène *MYCN* (trouvée dans 22% des tumeurs primitives), cinq gènes supplémentaires avec une fréquence de mutation somatique significative et un rôle biologique dans la pathologie cancéreuse ont été identifiés (Tableau IV) [146]. Ces altérations sont en général associées avec le neuroblastome à haut risque et à part l'hyperdiploïdie, aucune aberration génomique spécifique n'est liée au neuroblastome à faible risque ou à une régression spontanée de la tumeur [106, 151]. La rareté générale des mutations récurrentes dans le neuroblastome pédiatrique, plus particulièrement chez les patients atteints d'une tumeur à faible risque, signifie probablement que les facteurs tels que le nombre de copies et les altérations dans les modifications épigénétiques régulent l'expression des gènes et l'initiation tumorale [51]. Les gènes mutés, identifiés par le séquençage, sont discutés plus en détail ci-dessous.

Tableau IV : Gènes avec une fréquence significative de mutation somatique dans 240 tumeurs de neuroblastome à haut risque

Nom du gène	Fonction associée	Type d'altération	Fréquence (%)
<i>MYCN</i>	Facteur de transcription	Amplification	22 [152]
		Mutation activatrice	1,7 [146]
<i>ALK</i>	Récepteur tyrosine kinase	Mutation activatrice	9,2 [146]
		Amplification/duplication	3,4 [146]
<i>PTPN11</i>	Tyrosine phosphatase	Mutation activatrice	2,9 [146]
<i>ATRX</i>	Remodelage de la chromatine	Mutation inactivatrice	2,5 [153, 154]
<i>ARID1A/B</i>	Remodelage de la chromatine	Mutation inactivatrice	2-3 [155]
<i>NRAS</i>	Protéine de signalisation	Mutation activatrice	1 [146]

Tableau adapté de [51].

2.1.1 Amplification de l'oncogène *MYCN*

2.1.1.1 Importance de *MYCN* dans le neuroblastome pédiatrique

La découverte de l'amplification du gène *MYCN*, localisée sur le chromosome 2 (2p24), et son lien avec la progression agressive du cancer dans les années 1980 ont marqué le début de l'utilisation des altérations génomiques spécifiques à la tumeur pour la classification et le traitement du neuroblastome [77, 78]. D'ailleurs, l'amplification de *MYCN* (augmentation du nombre de copies du gène) corrèle fortement avec les stades avancés du cancer, une progression rapide de la tumeur et un mauvais pronostic (même chez les nourrissons et les patients atteints de stade peu avancé de cancer) (Tableau V) [78, 152, 156]. De plus, l'étude CCG-3881 de *Children's Cancer Group* a montré que la survie sans évènement à 3 ans des nourrissons âgés de moins d'un an atteints de neuroblastome métastatique sans amplification de *MYCN* se situe à 93%, mais elle est de seulement 10% pour ceux dont la tumeur est *MYCN* amplifiée, malgré la thérapie plus intensive [157].

Tableau V : Corrélation entre l'amplification de *MYCN*, le stade de cancer et le taux de survie des patients.

Stade au diagnostic	Amplification de <i>MYCN</i> (%)	Survie à 3 ans (%)
Ganglioneurome bénin	0	100
Stades peu avancés (1 et 2)	4	90
Stade 4S	8	80
Stades avancés (3 et 4)	31	30
Total	22	50

Tableau adapté de [152].

2.1.1.2 Développement de modèle murin de neuroblastome impliquant *MYCN*

Le gène *MYCN* est impliqué dans la différenciation neuronale et la migration des cellules progénitrices [158]. Le rôle de *MYCN* dans la tumorigenèse a été démontré avec le modèle murin surexprimant le transgène *MYCN* lors du développement de la CN en utilisant le promoteur de la tyrosine hydroxylase (TH) [159]. Ces souris TH-*MYCN* développent rapidement la tumeur et servent de modèles pour comprendre les mécanismes et tester des nouvelles thérapies [159]. De plus, les souris TH-*MYCN* ont été croisées avec d'autres souris génétiquement modifiées, comme celles exprimant le transgène *ALK* ou la caspase 8 mutants et les souris TH-*MYCN* caspase 8-/- développent des métastases à la moelle osseuse [160]. Aussi, une autre étude *in vivo* a démontré que la sous-expression de *MYCN* avec les oligonucléotides antisens entraîne une diminution de l'incidence de la tumeur et de sa masse dans un modèle de neuroblastome murin [161].

2.1.1.3 Structure et fonction de *MYCN*

MYCN est un membre de la famille d'oncogènes hautement conservés qui comprend aussi *c-MYC* et *MYCL* [162]. *MYCN* et *c-MYC* présentent une homologie structurelle et fonctionnelle, mais l'expression de *MYCN* est plus limitée dans l'espace et le temps pendant le développement [162, 163]. En effet, *c-MYC* est exprimé dans les tissus adultes et dans des cellules en prolifération au cours du développement, tandis que *MYCN* est plutôt exprimé dans les tissus neuraux, incluant le cerveau antérieur et le cerveau postérieur, dans les cellules pré-B, ainsi que dans les cellules de l'intestin, du cœur et des reins pendant l'embryogenèse [164, 165].

La protéine *MYCN* est un facteur de transcription hélice-boucle-hélice-leucine zipper (HLH-LZ) [166]. *MYCN* s'hétérodimérise avec la protéine *MAX* (*Myc-associated factor X*) via la région HLH-LZ pour se lier ensuite avec une haute affinité à la séquence E-box (*enhancer-box*) avec le motif consensus CACNNTG et agir en tant qu'un régulateur de la transcription (activer ou réprimer l'expression de ses gènes cibles) (Figure 8) [162, 164, 167, 168].

Les deux protéines, *MYCN* et *MAX*, ont des régions pour la liaison à l'ADN (interaction ADN-protéine par la région basique BR) et la dimérisation (interaction protéine-protéine par la région HLH-LZ) [162]. *MYCN* interagit aussi avec d'autres partenaires que *MAX* : par la boîte

d'homologie MYC III avec l'histone déméthylase LSD1 (*Lysine-specific demethylase 1*) et l'histone méthyltransférase EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2*) pour réprimer la transcription de gènes, mais aussi par la boîte d'homologie MYCN II avec l'histone acétyltransférase GCN5 (*General Control Non-repressed 5*) pour activer la transcription de gènes [169-171].

MYCN agit en tant que facteur de transcription de deux manières différentes : 1) le dimère MYCN/MAX se lie directement à la séquence spécifique E-box, puis recrute des complexes de chromatine qui à leur tour activent ou répriment la transcription ; 2) indirectement, le dimère MYCN/MAX compétitionne avec d'autres facteurs de transcription HLH-LZ pour la liaison à la séquence E-box pour finalement altérer l'activité du gène cible [166]. MYCN amplifie les gènes qui sont déjà transcriptionnellement actifs et n'a pas d'effet direct sur la transcription *de novo* et la répression des gènes exprimés [172-174]. De plus, le lien entre MYCN et la chromatine, ainsi que le manque de signature génique transcriptionnelle classique suggèrent que MYCN a un rôle épigénétique [174, 175].

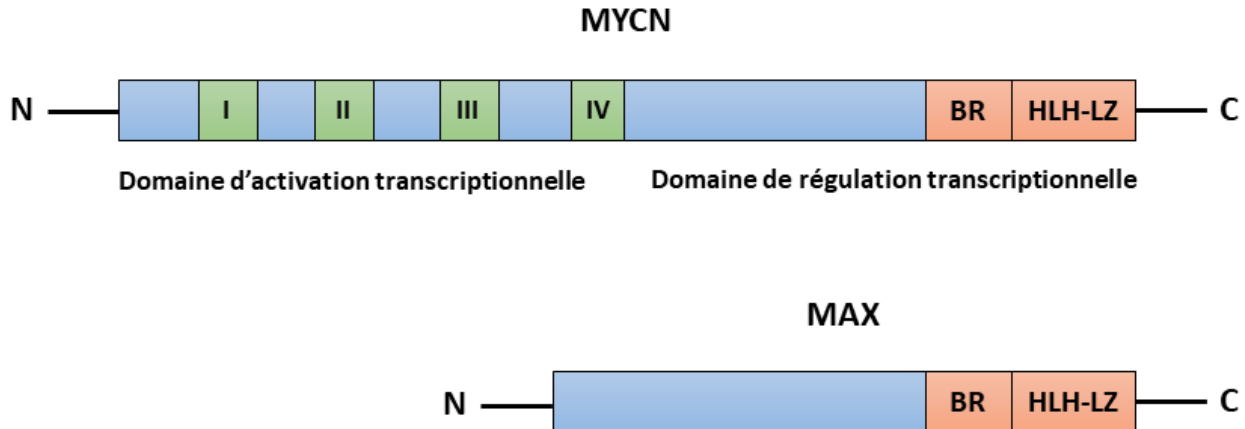


Figure 8 : Structure et régions fonctionnelles de MYCN et de son partenaire d'interaction MAX.

La partie N-terminale de MYCN contient quatre éléments hautement conservés dans les protéines MYC, connus comme les boîtes d'homologie MYC (I-IV). La partie C-terminale est composée de région basique (BR) qui se lie aux séquences d'ADN spécifiques, nommées E-box, et de région hélice-boucle-hélice-leucine-zipper (HLH-LZ) responsable de l'interaction avec MAX. La structure de la protéine MAX ressemble beaucoup à celle de MYCN, mais elle est beaucoup plus courte et comporte seulement les régions BR et HLH-LZ. *Diagramme adapté de [176].*

2.1.1.4 Rôle de MYCN dans la progression tumorale du neuroblastome

MYCN agit sur la progression du neuroblastome par l'activation de plusieurs processus : 1) la survie cellulaire ; 2) l'auto-renouvellement et la pluripotence ; 3) les métastases ; 4) la prolifération ; 5) la surveillance immunitaire et 6) l'angiogenèse [164].

1) La survie des cellules tumorales dépend du gène suppresseur de tumeur TP53 (*tumor protein 53*) et d'une protéase (la caspase-8) qui sont impliquées dans l'apoptose [164]. Comme les mutations au niveau du gène TP53 sont rarement retrouvées dans le neuroblastome au moment du diagnostic, MYCN semble plutôt interagir avec les régulateurs négatifs de la signalisation p53, comme le facteur de transcription H-Twist ou le proto-oncogène MDM2 (*mouse double minute 2*) [177, 178]. Par contre, les mutations surviennent souvent chez les membres de la voie p53 dans le neuroblastome en rechute, suggérant que les mutations menant au cancer résistant au traitement peuvent être initiées en réponse à la chimiothérapie cytotoxique [164]. Aussi, la perte de la fonction de la caspase-8 semble être un autre mécanisme pour échapper à l'apoptose dans le neuroblastome MYCN amplifié [179, 180].

En plus de l'inhibition des voies apoptotiques, le neuroblastome MYCN amplifié prolifère grâce à l'activation constitutive des cascades de signalisation du récepteur kinase à tropomyosine B (TRKB), fonctionnant par les deux voies de survie (autocrine et paracrine) [181]. Au contraire, le récepteur TRKB est faiblement exprimé dans le neuroblastome sans amplification de MYCN, puis ce récepteur est impliqué dans la résistance à la chimiothérapie [182, 183]. Il est intéressant de noter que MYCN réprime l'expression du récepteur kinase à tropomyosine A (TRKA), retrouvé dans le neuroblastome à faible risque et impliqué dans la régression spontanée du cancer, en recrutant une histone désacétylase HDAC1 sur le promoteur de TRKA qui induira l'état condensé de la chromatine, nommé l'hétérochromatine [184].

2) MYCN est impliqué dans le maintien des cellules du neuroblastome dans leur état souche : en inhibant les voies de différenciation et en activant les gènes d'auto-renouvellement (ex : protéine complexe BMI-1 de polycomb ; un ligand de Notch DLL3, *Delta-like ligand 3*) et de pluripotence (ex : KLF2 et KLF4, *Kruppel-like factor 2*) [185-188]. Le mécanisme de régulation de BMI1 consiste en la liaison de MYCN à la séquence E-box dans le promoteur de BMI1 [186].

3) Le niveau de MYCN corrèle avec un cancer invasif et influence plusieurs caractéristiques métastatiques, comme l'adhésion, la motilité et l'invasion cellulaire ou la dégradation de matrice environnante [189, 190]. En effet, MYCN diminue l'expression des intégrines $\alpha 1$ et $\beta 1$ et contribue ainsi le détachement des cellules de la matrice extracellulaire pour pouvoir se disséminer et envahir le corps [191, 192]. Aussi, MYCN active la transcription de la FAK (*focal adhesion kinase*), un régulateur important de la signalisation des intégrines favorisant la migration cellulaire [193].

4) MYCN favorise la progression des cellules dans le cycle cellulaire et leur prolifération de différentes manières [164]. Pour le neuroblastome MYCN amplifié, l'arrêt en phase G1 n'est pas possible en réponse à l'irradiation et aux dommages à l'ADN à cause de la régulation à la baisse de TP53INP1 (*Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 1*) et la régulation à la hausse de CDK4 (*cyclin-dependent kinase 4*) et de SKP2 (*S-Phase Kinase Associated Protein 2*) laissant CDK2 s'échapper à son inhibiteur p21 [194-197]. De plus, le neuroblastome MYCN amplifié devient réfractaire à la chimiothérapie standard probablement à cause de la régulation positive par MYCN de CHK1 (*checkpoint kinase 1*), un régulateur de la phase S et des points de contrôle en G2/M [198]. MYCN peut aussi inhiber directement l'expression des protéines de différenciation anti-prolifératives CDKL5 (*cyclin-dependent kinase-like 5*) qui bloquent les cellules dans la phase G0/G1 [199]. Finalement, MYCN se lie à ID2 pour activer sa transcription qui à son tour mène à la perturbation de la fonction de suppresseur de tumeur de Rb et permet la progression dans le cycle cellulaire [200, 201]. Ainsi, le neuroblastome avec l'amplification de MYCN contient un niveau élevé d'ID2 [202].

5) MYCN affecte l'immunité en modulant l'expression des antigènes sur la surface des cellules tumorales (ex : en inhibant la protéine MCP-1/CCL2 (*monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2*), impliquée dans la chimioattraction des cellules NK) [203]. Ainsi, en supprimant l'expression MYCN dans les lignées de neuroblastome MYCN amplifiée, la production de MCP1 est restaurée et les cellules NK sont attirées vers la tumeur et à l'inverse, cette capacité immunitaire est perdue lorsque MYCN est surexprimé [164]. MYCN semble agir par sa liaison au site E-box dans le promoteur de MCP-1 [203]. Finalement, la moelle osseuse des patients atteints de neuroblastome avec l'amplification de MYCN et les métastases à la moelle osseuse contient quatre fois moins des cellules NK en comparant avec le neuroblastome MYCN non amplifié [203].

6) Une bonne vascularisation tumorale est liée à l'amplification de MYCN, un mauvais taux de survie et une dissémination rapide de cancer à travers le corps [204-206]. Ainsi, l'inhibiteur de la voie PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*)/mTOR (*mammalian target of rapamycin*), NVP-BEZ235, a inhibé la croissance tumorale dans le neuroblastome MYCN amplifié et a démontré un effet anti-angiogénique en supprimant la transcription et la sécrétion de l'angiogénine et du facteur VEGF (*vascular endothelial growth factor*) [207-209].

2.1.1.5 Traitements du neuroblastome ciblant l'oncogène MYCN

Comme la protéine MYCN participe dans la tumorigenèse et des nombreux processus cellulaires, elle constitue une cible thérapeutique de grand intérêt. Jusqu'à présent, il n'est pas possible de cibler directement MYCN avec les médicaments à petites molécules. Cependant, les inhibiteurs bloquant l'hétérodimérisation de MYCN et MAX ; les inhibiteurs d'Aurora Kinase A et de PI3K/mTOR qui déstabilisent la protéine MYCN ou les inhibiteurs de BET (*bromodomain and extra-terminal domain*), des régulateurs épigénétiques interférant avec la régulation de l'activité transcriptionnelle, constituent des approches thérapeutiques potentielles (Tableau VI).

Tableau VI : Inhibiteurs indirects de l'oncogène MYCN pour le traitement de neuroblastome.

Cible	Agent thérapeutiques
MAX	10058-F4 [210] 10074-G5 [210, 211]
Aurora Kinase A	MLN8237 (ou alisertib) [212]
PI3K/mTOR	SF1126 [213]
BET	JQ1 [214] GSK1324726A (ou I-BET726) [215]

Tableau adapté de [144].

2.1.2 Mutation activatrice du gène ALK

2.1.2.1 Mécanisme et conséquence des mutations d'ALK

Malgré le fait que le neuroblastome familial comprend seulement 1-2% de tous les cas de neuroblastome, l'étude des anomalies génétiques dans ce type de neuroblastome rare a permis une meilleure compréhension des mécanismes et des cibles moléculaires impliquées aussi dans le neuroblastome non héréditaire [24]. En effet, la mutation activatrice du gène ALK (chromosome 2p23) prédispose au neuroblastome familial et compte pour 75% des cas héréditaires, mais les mutations somatiques dans ALK ou son amplification se trouvent également dans ~14% des neuroblastomes à haut risque [28, 216-218].

ALK est un récepteur tyrosine kinase impliqué en tant qu'oncogène dans plusieurs cancers surtout adultes [217]. Il est exprimé seulement dans les tissus nerveux et joue un rôle important dans la différenciation neuronale [217]. Les membres de la famille FAM (FAM150A et FAM150B) sont des ligands qui activent ALK [219]. ALK agit conjointement avec MYCN pour favoriser la pathogénèse du neuroblastome : il active l'expression de MYCN grâce à l'activation du promoteur MYCN et la stabilisation de la protéine MYCN (possiblement par AKT et ERK, *extracellular signal-regulated kinase*, activés) [220, 221]. Cette co-amplification d'ALK et de MYCN s'explique par leur proximité physique (en 2p23 et en 2p24) [222].

Dans le neuroblastome, les mutations ponctuelles entraînent l'autophosphorylation du récepteur ALK indépendante du ligand et l'activation constitutive de son activité kinase donnant lieu à une signalisation aberrante des voies de signalisation en aval d'ALK (voies RAS-MAPK et PI3K/AKT/mTOR, impliquées dans la prolifération, la survie et la migration tumorales) [223, 224]. D'ailleurs, la voie RAS-MAPK est souvent mutée et activée dans le neuroblastome en rechute et provoque le développement du cancer [225]. Il y a un lien entre le génotype et le phénotype : les mutations activant le plus fortement le récepteur ALK sont les plus pénétrantes [226]. Dans toutes les mutations d'ALK prédisposant au neuroblastome, la pénétrance est de ~50% [226].

2.1.2.2 Mutations retrouvées dans ALK

Les mutations familiales (germinales) et non familiales (somatiques) dans ALK se trouvent au niveau du domaine tyrosine kinase (Tableau VII) [28]. Les 3 mutations (F1174L, R1275Q et F1245C) représentent ~85% des mutations ALK dans le neuroblastome [227]. La mutation R1275Q est trouvée dans le neuroblastome germinale et sporadique : elle diminue l'expression des gènes associées à la matrice extracellulaire (MEC) et à la membrane basale (MB) dans les tumeurs [228]. En effet, il a été observé que les tumeurs avec la mutation R1275Q et l'amplification de MYCN ont une réduction des protéines liées à la MEC et la MB (mais une augmentation des métastases et du cancer invasif) par rapport aux tumeurs seulement MYCN amplifiées [228]. Finalement, l'augmentation de la fréquence des mutations ALK a été remarqué lors de la rechute [229].

Tableau VII : Mutations germinales et somatiques d'ALK.

Mutation	Type de mutation	Région	Probabilité de mutation activatrice*
G1128A	Germinale	Boucle-P	0.95
R1192P	Germinale	Hélice-C	0.96
R1275Q	Germinale et somatique	Boucle activatrice	0.91
D1091N	Somatique	N-terminale	0.29
M1166R	Somatique	Hélice-C	0.79
I1171N	Somatique	Hélice-C	0.85
F1174I	Somatique	Fin de l'hélice-C	0.92
F1174L	Somatique	Fin de l'hélice-C	0.96
F1245C	Somatique	Boucle catalytique	0.94
F1245V	Somatique	Boucle catalytique	0.91
I1250T	Somatique	Boucle catalytique	0.87

* : calcul de la probabilité que l'altération entraîne l'activation oncogénique (basé sur la méthode de Torkamani et Schork). *Tableau adapté de [28].*

2.1.2.3 Traitements du neuroblastome ciblant les mutations dans ALK

Contrairement à une altération telle que l'amplification de MYCN, les mutations d'ALK peuvent être inhibées par des petites molécules [28]. Le premier inhibiteur développé est le crizotinib : il inhibe la mutation la plus fréquente d'ALK (R1275Q), mais aussi son amplification *in vitro* et *in vivo*, conduisant à une régression tumorale [230]. Cet inhibiteur compétitif à petite molécule de l'activité d'ALK est approuvé par la FDA pour les patients adultes atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules avec une translocation d'ALK [217]. Malgré des résultats très encourageants en phase préclinique, les études cliniques ont montré que le crizotinib est efficace seulement pour un faible pourcentage de patients atteints de neuroblastome à mutation ALK [230]. Ainsi, les inhibiteurs alternatifs sont en cours de développement et des efforts sont mis pour comprendre et contourner les mécanismes de résistance [231, 232].

Le lorlatinib (PF-06463922), est un inhibiteur d'ALK/ROS1 de troisième génération efficace contre les lignées cellulaires du neuroblastome, les modèles murins de xéno-greffes mutées ALK (mutations F1174L, F1245C et R1275Q) et les xéno-greffes résistantes au crizotinib [233]. Il a une affinité de liaison à ALK supérieure à celle du crizotinib [233]. L'essai de phase 1 du lorlatinib est actuellement en cours pour les patients atteints de neuroblastome avec une aberration d'ALK (NCT03107988) [217].

Finalement, un autre inhibiteur d'ALK, l'alecitinib, a démontré des résultats d'efficacité et de toxicité prometteurs dans les modèles précliniques de neuroblastome [234]. En monothérapie, l'alecitinib induit l'apoptose dans les lignées cellulaires F1174L mutées et inhibe la croissance tumorale dans les modèles de souris de neuroblastome transgénique TH-MYCN [231]. L'essai pour les patients adultes et pédiatriques atteints de tumeurs malignes impliquant ALK est en cours (NCT03194893) [217].

2.1.3 Mutation inactivatrice du gène PHOX2B

2.1.3.1 Rôle des mutations de PHOX2B dans le neuroblastome familial

PHOX2B, le premier gène de prédisposition au neuroblastome identifié, code pour un facteur de transcription impliqué dans le développement de la crête neurale [217]. Les mutations germinales de PHOX2B sont détectées chez 6-10% des cas de neuroblastome héréditaire, mais sont très rarement rencontrées dans les tumeurs sporadiques [235, 236]. PHOX2B est souvent muté chez les patients atteints de syndrome d'hypoventilation centrale congénitale et la maladie de Hirschsprung et constitue un marqueur pronostic pour le développement de cancer [237]. Le dépistage de neuroblastome chez les enfants asymptomatiques porteurs de la mutation PHOX2B (ou ALK) se fait généralement par des échographies abdominales et des taux de catécholamines urinaires tous les trois mois jusqu'à l'âge de 5 ans [238].

Les mutations de perte de fonction dans le gène PHOX2B, situé sur le chromosome 4p12, perturbent la différenciation terminale des cellules du neuroblastome [237]. Parmi les mutations germinales de PHOX2B couramment retrouvées chez les patients se trouvent les mutations R100L (associée à la maladie de Hirschsprung et aux tumeurs neuroblastiques), G197D, R141G, ainsi que les mutations répétées de la polyalanine (associées avec le syndrome d'hypoventilation centrale congénitale) [218].

La surexpression de PHOX2B corrèle avec l'augmentation de la protéine ALK [239]. En effet, PHOX2B contribue à la pathogenèse cancéreuse en modulant l'expression d'ALK par sa liaison directe au promoteur du gène ALK [239]. De plus, l'expression élevée de PHOX2B a été trouvée dans les lignées cellulaires de neuroblastome en comparaison aux tissus normaux [239]. PHOX2B corrèle aussi avec MYCN : un niveau élevé de PHOX2B ont été trouvés dans les lignées cellulaires MYCN amplifiées, tandis que l'expression de PHOX2B n'est pas détectée dans les lignées cellulaires MYCN non amplifiées [240]. Finalement, de la même manière que pour le gène ALK, la mutation de PHOX2B est liée à l'activation de la voie RAS-MAPK dans les lignées cellulaires de neuroblastome [241].

Il reste encore à découvrir et à comprendre la cause des 15% de neuroblastomes familiaux restants qui n'ont pas de mutations au niveau de PHOX2B ou ALK [238].

2.1.3.2 Traitements du neuroblastome ciblant les mutations dans PHOX2B

En phase préclinique, plusieurs molécules ont été efficaces pour inhiber PHOX2B [144]. Ainsi, le mycophénolate mofétil diminue l'expression de l'ARNm et de la protéine PHOX2B dans la lignée cellulaire de neuroblastome IMR-32, clive la caspase 3/7 et induit l'apoptose [242]. De plus, le composé XAV939, la diphénylhydantoïne, l'acide SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*) et la curcumine, sont les inhibiteurs efficaces de PHOX2B [243]. Le composé XAV939 augmente significativement la sensibilité des lignées cellulaires IMR-32 et SH-SY5Y à la chimiothérapie par la doxorubicine dans les cultures conventionnelle (2D) et tridimensionnelle (3D) [244].

2.1.4 Autres mutations dans le neuroblastome

2.1.4.1 PTPN11

PTPN11 (*protein tyrosine phosphatase 11*), situé sur le chromosome 12, régule plusieurs voies de signalisation : par exemple, la mutation de gain de fonction dans PTPN11 active la voie RAS-MAPK dans les tumeurs de neuroblastome en rechute [225]. Les mutations germinales de PTPN11 sont retrouvées chez les patients avec le syndrome de Noonan et augmentent le risque de cancers, notamment le neuroblastome [245]. Le mécanisme de PTPN11 dans la pathogenèse du neuroblastome n'est pas compris, mais semble impliquer la signalisation de PTPN11 en amont de RAS, qui est aussi muté dans un petit pourcentage de neuroblastome.

2.1.4.2 ATRX

ATRX (*alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*), situé sur le chromosome Xq21, fait partie de la famille des protéines de remodelage de la chromatine et participe à l'assemblage des nucléosomes et le maintien des télomères [164]. Les mutations d'ATRX sont associées à une perte de la protéine nucléaire ATRX, à l'activation de la voie ALT (*alternative lengthening of telomeres*) et à de longs télomères [154].

Les altérations génétiques de perte de fonction d'ATRX qui encode l'ARN-hélicase, sont rares dans les tumeurs avec l'amplification de MYCN [154]. Les mutations d'ATRX sont plus fréquentes chez les adolescents et les jeunes adultes atteints de neuroblastome, un groupe de patients avec généralement un mauvais pronostic : elles sont présentes dans 44% des tumeurs de patients âgés de plus de 12 ans, dans 9% de patients âgés entre 1,5 et 12 ans et dans 0% pour les nourrissons âgés de moins de 1,5 ans [154].

2.1.4.3 ARID1A/1B

ARID1A et ARID1B (*AT-rich interactive domain 1A/1B*) ont aussi un rôle dans le remodelage de la chromatine [51]. Les mutations de perte de fonction d'ARID1A/1B sont associées avec un neuroblastome agressif, impliquant un faible taux de survie et un échec thérapeutique [155]. Le rôle des mutations d'ARID1A/1B dans le neuroblastome ne sont pas compris, mais les mutations d'ARID1B sont oncogènes dans certains cancers de l'adulte [246].

2.2 Aberrations chromosomiques dans le neuroblastome

Comme le neuroblastome est un cancer cliniquement hétérogène, il possède plusieurs anomalies chromosomiques. Les patients atteints de neuroblastome peuvent être classifiés en trois sous-types génomiques :

- Les tumeurs de type 1 se trouvant principalement chez les nourrissons sont à bas risque, ont un pronostic favorable, un contenu en ADN hyperdiploïde ou presque triploïde (3N) et n'ont pas d'anomalies chromosomiques ou d'amplification de MYCN [152].
- Les tumeurs de type 2A sont à risque intermédiaire, quasi diploïdes (2N) ou tétraploïdes (4N) et MYCN non amplifiées, présentent souvent un gain du chromosome 17q ou une perte du chromosome 11q et/ou 14q [152].
- Les tumeurs de type 2B sont à haut risque, ont une amplification de MYCN, un gain du chromosome 17q ou une perte d'hétérozygotie du bras court du chromosome 1p [152].

2.2.1 Gain du chromosome 17q

Le gain du bras long du chromosome 17 est l'anomalie chromosomique la plus fréquente dans le neuroblastome : il est présent dans ~50% des neuroblastomes en général et dans jusqu'à 90% des tumeurs à haut risque [247]. Le gain de 17q est associé avec les facteurs pronostiques défavorables, comme le cancer métastatique (stade 4), la diploïdie, l'âge du patient supérieur à un an, l'amplification de MYCN et la délétion du chromosome 1p [248]. La présence ou non du gain du chromosome 17q influence énormément le pronostic des tumeurs de stade bas et sans l'amplification de MYCN : la survie globale à 5 ans des patients se situe à 100% en absence de gain 17q, mais elle est de 52,5% lorsque le gain du chromosome 17q est présent [249].

PPM1D est un gène actif dans la région du chromosome 17q qui régule négativement p53 et agit donc comme un oncogène [250]. L'inactivation de PPM1D, situé à 17q23.2, conduit à l'inhibition de la prolifération cellulaire [251].

2.2.2 Perte du chromosome 11q

La perte 11q est présente dans ~1/3 des cas de neuroblastome, se trouve plus souvent dans le cancer de stade 4 et corrèle avec un mauvais pronostic, mais est rarement associée à l'amplification de MYCN [252]. Le profil d'expression génique défavorable associé à 11q semble être causé par la perte du gène suppresseur de tumeur TSLC1/IGSF4/CADM1 (*tumor suppressor in lung cancer 1/immunoglobulin superfamily 4/cell adhesion molecule 1*) situé en 11q23 et impliqué dans le cancer du poumon non à petites cellules [253]. Ainsi, l'inhibition de l'expression de CADM1 corrèle avec le neuroblastome défavorable, tandis que son surexpression *in vitro* résulte en un profil cancéreux favorable et une diminution de la prolifération dans les cellules de neuroblastome [253].

2.2.3 Perte du chromosome 1p

La perte d'hétérozygotie du bras court du chromosome 1p dans le neuroblastome est liée à des caractéristiques à haut risque, comme les métastases, l'amplification de MYCN, l'histologie défavorable et l'âge du patient supérieur à un an [254]. La perte de 1p est liée à un pronostic défavorable (surtout chez les nourrissons) : la survie sans évènement à 3 ans est de 100% pour les tumeurs des stades 1, 2 ou 4S sans la perte de 1p, mais elle est de 34% pour les tumeurs avec la perte de 1p ; pour le cancer de stade 3 ou 4, les survies sont de 53% (sans la perte de 1p) et 0% (avec la perte de 1p) [255].

Un gène suppresseur de tumeur pertinent pour le chromosome 1p est CHD5, un membre de la famille des chromodomains situé sur le chromosome 1p36, qui affecte la prolifération et l'apoptose par la voie p19Arf/p53 [256]. Il n'y a pas de mutations ou de délétions somatiques de CHD5 et son expression semble être régulée par les modifications épigénétiques : le promoteur de CHD5 est souvent méthylé dans les tumeurs à haut risque avec la délétion 1p et l'amplification de MYCN [257].

Chapitre 3 – Rôle de l'épigénétique dans le neuroblastome

En plus des anomalies dans les gènes spécifiques dans le neuroblastome ou les aberrations chromosomiques, l'expression des gènes est également régulée par les altérations épigénétiques. Les mécanismes épigénétiques se font naturellement et sont essentiels pour le fonctionnement de l'organisme, mais leur dérégulation peut mener à la pathogenèse de plusieurs maladies (auto-immunes, cognitives, respiratoires, cardiaques...) et des tumeurs malignes de presque tous les types [258]. En effet, près de 75 gènes ont été identifiés comme étant épigénétiquement modifiés dans des lignées cellulaires de neuroblastome et/ou des tumeurs primaires de patients [55].

L'épigénétique inclut des modifications transmissibles entre les cellules mères et filles (l'hérédité mitotique) et entre les générations (l'hérédité méiotique) de l'expression des gènes sans toutefois changer la séquence de l'ADN [259]. Les mécanismes épigénétiques prédominants incluent : 1) la méthylation sur les cytosines de l'ADN ; 2) les modifications post-traductionnelles covalentes des histones (l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitylation, la sumoylation et l'ADP-ribosylation), ainsi que le remodelage de la chromatine (par exemple, le remodelage de la chromatine ATP-dépendant par BRG1, *Brahma-related gene-1*) ; 3) l'expression aberrante de l'ARN non-codant (Figure 9) [260].

Les modifications de l'ADN et des histones sont réversibles et régulées de manière dynamique par les enzymes épigénétiques [261]. Les marqueurs (*writers*) ajoutent différentes marques épigénétiques sur les cytosines de l'ADN et sur les résidus d'acides aminés spécifiques des histones, alors que les effaceurs (*erasers*) suppriment ces marques [261]. Les lecteurs (*readers*) sont les protéines qui possèdent des domaines spécialisés capables de reconnaître les modifications épigénétiques spécifiques et les interpréter [261]. Les marqueurs épigénétiques sont : les DNMTs (ADN méthyltransférases), les HMTs (histone méthyltransférases), les PRMTs (protéine méthyltransférases) et les HATs (histone acétyltransférases) ; les effaceurs incluent : les déméthylases de l'ADN et des histones et les HDACs (histone désacétylases) ; finalement, les lecteurs sont composés des protéines MBDs (domaines de liaison méthyl-CpG) reconnaissant l'ADN méthylé, des protéines à chromodomaine et à tudordomaine identifiant la méthylation des histones et des protéines à bromodomaine identifiant l'acétylation des histones [261].

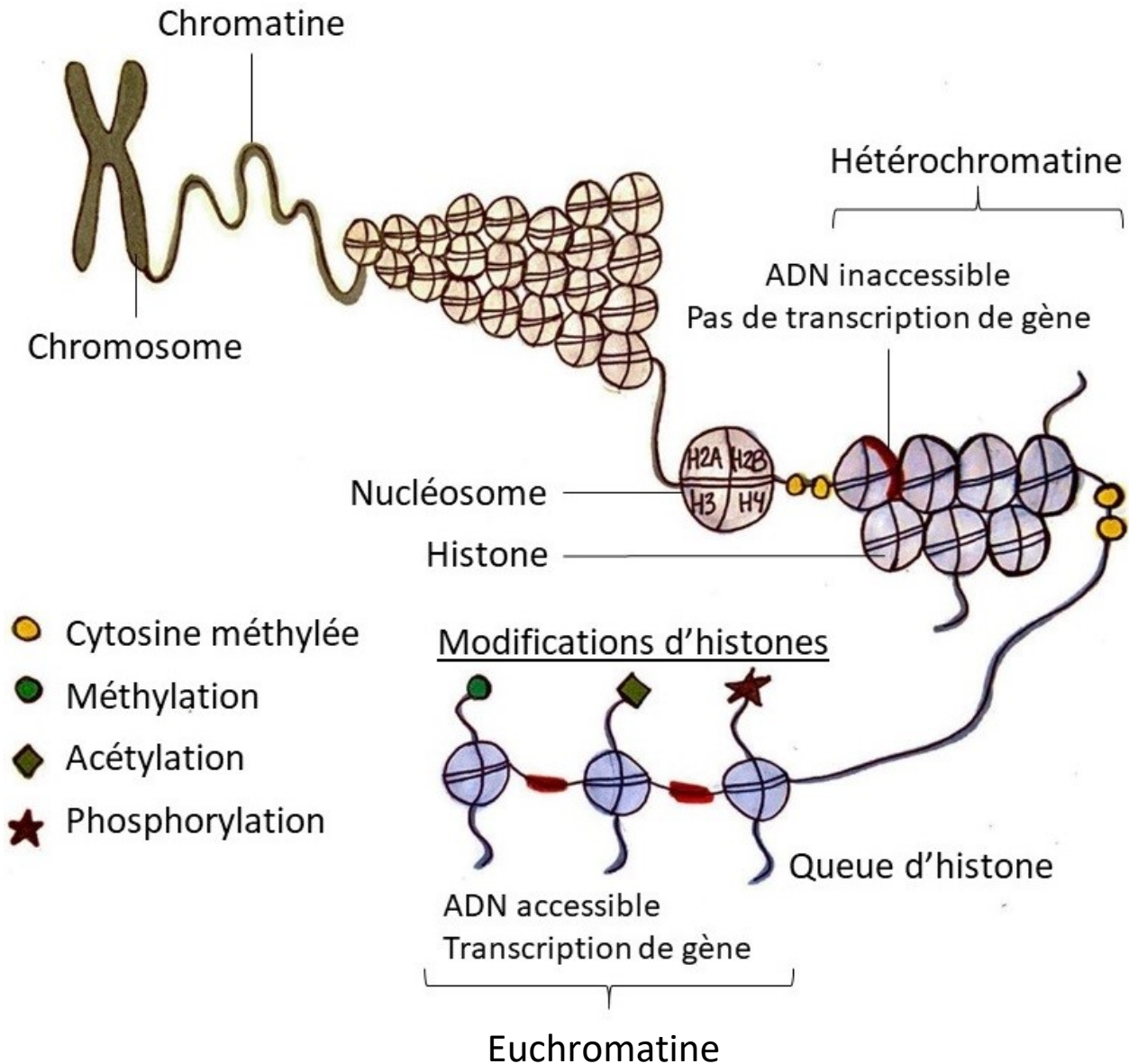


Figure 9 : Organisation du matériel génétique dans la cellule et les mécanismes épigénétiques.

Pour atteindre la compaction nucléaire nécessaire, l'ADN est enroulé autour des protéines histones centrales (octamères d'histones) et conditionné dans les structures de chromatine compactes (nucléosomes, composés de 2 copies de H2A, H2B, H3, H4 avec de l'ADN enroulé autour). La régulation épigénétique de l'expression des gènes est contrôlée par les modifications post-traductionnelles covalentes sur les queues des histones, favorisant le recrutement de complexes protéiques qui : 1) remodelent les nucléosomes résultant en une chromatine condensée (l'hétérochromatine) défavorisant la transcription des gènes ou à la chromatine plus relâchée (l'euchromatine) favorisant la transcription et 2) recrutent les protéines responsables de la méthylation de l'ADN qui affecte également la transcription. *Illustration adaptée de [262].*

3.1 Méthylation de l'ADN

3.1.1 Généralités

La méthylation de l'ADN se produit principalement par les enzymes DNMTs qui catalysent le transfert du groupe méthyle (CH₃) du donneur, la S-adénosylméthionine (SAM), vers une cytosine (C) précédant une guanine (G) (les sites CpG, où « p » représente le lien phosphodiester reliant le dinucléotide cytosine-guanine) entraînant la formation de 5-méthylcytosine [261]. Le méthyle se trouve dans le sillon majeur de l'ADN et modifie les caractéristiques biophysiques de l'ADN [260]. En comparant aux autres nucléotides de l'ADN, la cytosine est plus susceptible à la méthylation et ~3% des cytosines de l'ADN humain sont méthylées [263]. L'ajout de groupe méthyle n'influence pas la liaison hydrogène normale entre la cytosine et la guanine [260].

Près la moitié des îlots CpG du génome se retrouvent dans les régions promotrices des gènes, mais l'autre moitié sont dans des régions intergéniques (entre les séquences codantes de l'ADN) et des séquences génomiques répétitives afin de maintenir un état transcriptionnellement inactif [264]. De plus, dans les conditions physiologiques normales, environ 80% des dinucléotides CpG situés en dehors de la région promotrice sont méthylés et au contraire, les CpG dans la région promotrice ne sont pas méthylés ou ont un niveau de méthylation relativement faible (Figure 10) [263]. La méthylation inhibe la reconnaissance de l'ADN par certaines protéines, mais elle favorise la liaison à l'ADN d'autres protéines [265].

3.1.2. Hypométhylation et hyperméthylation de l'ADN dans les cellules tumorales

Les cellules cancéreuses sont caractérisées principalement par deux types d'altérations épigénétiques : 1) l'hypométhylation globale dans les régions intragéniques et intergéniques de l'ADN (les séquences répétées) et 2) l'hyperméthylation localisée sur les régions promotrices des gènes (Figure 10) [259].

L'hypométhylation globale favorise la transcription des éléments transposables et des séquences répétées conduisant à l'instabilité chromosomique qui peut changer le génotype du

cancer à différents niveaux, incluant les translocations, les réarrangements chromosomiques et les délétions [266]. L'hypométhylation est aussi associée à la réactivation des proto-oncogènes, comme c-Myc [267]. Habituellement, l'hypométhylation globale augmente au fur et à mesure que la tumeur progresse et corrèle donc avec un mauvais pronostic des patients [259].

L'hyperméthylation est spécifique à un gène (ex : gène suppresseur de tumeur p53) et entraîne son répression transcriptionnelle et l'inactivation de l'expression de la protéine associée [259]. Ainsi, l'hyperméthylation de la région promotrice de gène est un mécanisme d'inhibition des gènes alternatifs à la mutation ou à la perte allélique [268]. Elle survient dans des processus initiant le cancer : l'angiogenèse, la réparation de l'ADN, l'interaction entre les cellules, le cycle cellulaire et l'apoptose [259]. L'hyperméthylation se produit aussi lors des mécanismes physiologiques (ex : pour inactiver le deuxième chromosome X chez les femmes) [259].

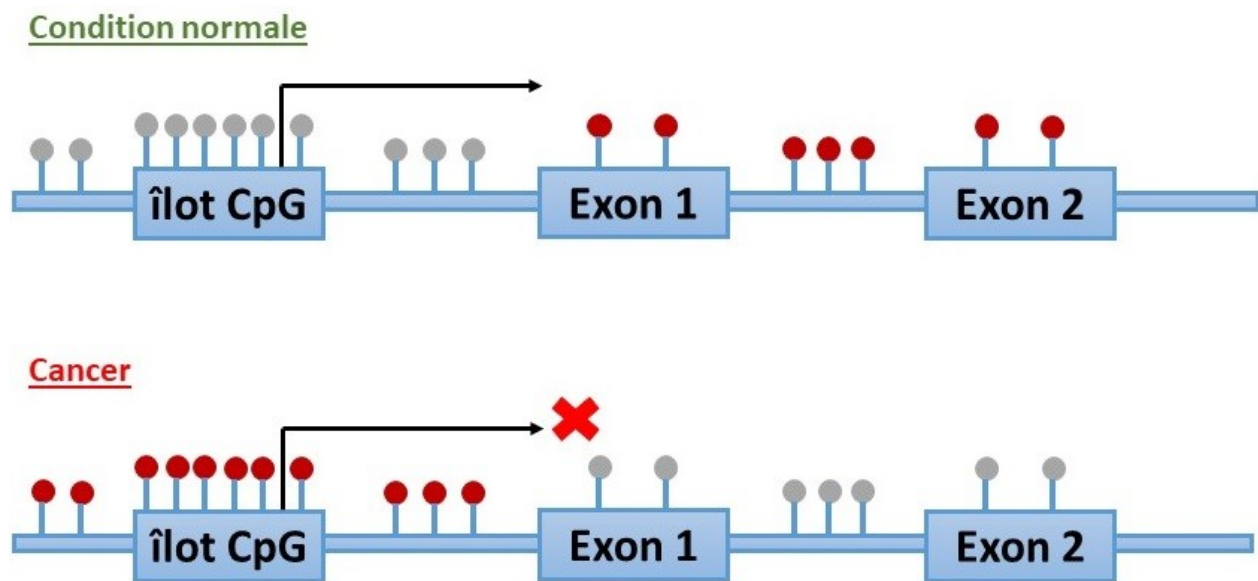


Figure 10 : Distribution de la méthylation dans l'ADN et son influence sur l'expression des gènes.

Dans les cellules normales, les îlots CpG sont non-méthylés (gris) et les CpG en dehors de la région promotrice sont méthylés (rouge). Par contre, dans les cellules tumorales, une hyperméthylation des sites CpG se produit dans la région promotrice d'un gène et une hypométhylation globale. L'hyperméthylation locale du gène entraîne souvent la répression de sa transcription et donc, inhibe l'expression de la protéine. *Illustration adaptée de [259].*

3.1.3 Méthylation de l'ADN

Les ADN méthyltransférases (DNMTs) sont une famille d'enzymes responsables de la méthylation de l'ADN, composée de 4 membres (DNMT1, DNMT2, DNMT3a et DNMT3b) [263]. Les méthyltransférases *de novo* (DNMT3a, DNMT3b) participent à la méthylation de la cytosine sur les sites CpG auparavant non méthylés [269]. La méthyltransférase de maintenance (DNMT1) entretient les mécanismes de méthylation de l'ADN déjà existants (par l'hérédité épigénétique pendant la réplication) [269]. En effet, la DNMT1 a une prédisposition pour l'ADN hémi-méthylé : elle reconnaît et copie le schéma de méthylation du brin d'ADN parental, puis le transmet au brin fille nouvellement synthétisé [270]. La DNMT2 a une faible capacité de méthylation de l'ADN *in vitro* et semble être plutôt impliquée dans la méthylation de l'ARN [271].

L'ADN méthylé est reconnu par la famille des protéines MBD (domaine de liaison méthyl-CpG), composée de MBD1 à MBD4 et par la protéine MeCP2 (protéine de liaison méthyl-CpG 2) qui reconnaissent spécifiquement les dinucléotides méthylés [263]. Toute la famille MBD peut participer au remodelage de la chromatine et inhiber l'expression génique, mais la protéine centrale est la protéine MeCP2 [263]. Elle recrute des complexes co-répresseurs de remodelage de la chromatine dans les régions d'ADN se liant de manière spécifique à la protéine MeCP2 [272].

3.1.4 Déméthylation de l'ADN

Le premier mécanisme de déméthylation est une déméthylation « passive » qui consiste en une perte lente de maintien du schéma de méthylation des cytosines de l'ADN [260]. Ce mécanisme survient lorsque la méthylation des sites CpG ne se propage pas après des cycles successifs de réplication de l'ADN à cause du manque de DNMT1 et l'élimination active ou enzymatique du groupe méthyle de la 5-méthylcytosine de l'ADN [261]. Le deuxième mécanisme de déméthylation « active » de l'ADN est indépendant de la réplication de l'ADN, plus rapide et passe par les réactions enzymatiques [261]. En effet, les membres de la famille des protéines TET (*ten-eleven translocation*), TET1, TET2 et TET3, initient la réaction d'oxydation convertissant la 5-méthylcytosine en 5-hydroxyméthylcytosine et en 5-formylcytosine et 5-carboxylcytosine après d'autres étapes d'oxydation [273].

3.1.5 Méthylation de l'ADN comme cible thérapeutique dans le neuroblastome

Les mécanismes épigénétiques constituent des cibles potentielles pour le développement des nouvelles stratégies thérapeutiques contre le neuroblastome qui visent essentiellement à renverser les modifications épigénétiques pour réactiver les gènes suppresseurs de tumeur et inhiber la prolifération tumorale [246].

La co-transfection de DNMT3a/3b dans des lignées cellulaires de neuroblastome de souris est associée à la résistance au cisplatine et l'inhibition de ces enzymes avec l'inhibiteur de DNMT, la 5'-azacytidine, s'intercalant avec l'ADN, augmente la réponse au cisplatine [274]. Le traitement des lignées cellulaires humaines avec un autre inhibiteur de DNMT, la 5-aza-2'-désoxycytidine (DAC), démontre des effets antiprolifératifs, puis induit la différenciation cellulaire [275]. Aussi, la combinaison de DAC (ou décitabine) et de chimiothérapie, incluant le cisplatine, la doxorubicine et l'étoposide, permet un meilleur résultat thérapeutique que DAC seul [276]. Pour le neuroblastome, trois essais ont terminé les études de phase I pour la décitabine (NCT01241162 ; NCT00075634 ; NCT03236857).

Les caractéristiques apoptotiques sont souvent perdues pour les cellules tumorales [277]. En effet, une étude utilisant la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) sensible à la méthylation a montré que dans les lignées cellulaires de neuroblastome, la perte d'expression de la caspase 8 (codée par CASP8), impliquée dans l'apoptose, est associée à l'augmentation de la méthylation de l'ADN [277]. L'hyperméthylation spécifique de CASP8 constitue un mécanisme d'inhibition de gène alternatif aux délétions [277]. La perte de l'expression de la caspase 8, surtout dans les tumeurs de neuroblastomes MYCN amplifiées, permet la prolifération cellulaire désordonnée [277]. Le traitement avec la 5'-azacytidine restaure l'expression de CASP8 dans 2/3 des lignées cellulaires de neuroblastome à l'étude [277]. Les résultats obtenus pour les lignées cellulaires ont été aussi validés dans une cohorte de patients atteints de neuroblastome [179].

Finalement, une série de gènes méthylés dans le neuroblastome, appelée CIMP (*CpG island methylator phenotype*), est associée avec un phénotype de neuroblastome à haut risque et un mauvais pronostic [278]. En effet, les patients avec CIMP ont une survie globale d'environ 50%, tandis que les patients sans CIMP ont une survie globale près de 100% [278].

3.2 Modifications post-traductionnelles des histones et remodelage de la chromatine

La structure et la configuration de la chromatine, influencées par les modifications post-traductionnelles des queues d'histones, lui permettent d'adopter une structure plus relâchée ou plus compactée, permettant l'activation ou la répression de gènes respectivement [277]. Les modifications post-traductionnelles covalentes des histones (l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitination) se produisent principalement sur les résidus de lysine (K), arginine (R), sérine (S) et thréonine (T) [258].

3.2.1 Acétylation des histones

L'acétylation des résidus de lysine dans les histones est liée à l'activation transcriptionnelle [259]. Le groupe acétyle est transféré de l'acétyl co-A par les enzymes histone acétyltransférases (HATs) [261]. L'acétylation neutralise la charge positive du résidu lysine dans la queue d'histone et réduit la force de liaison entre les queues d'histone et l'ADN, permettant ainsi l'ouverture du complexe ADN/histone pour les facteurs de transcription [260].

Les HATs sont classés en deux grandes catégories selon leur emplacement dans la cellule : 1) les HATs de type A se trouvent dans le noyau et acétylent les histones associées à la chromatine, 2) les HATs de type B se trouvent dans le cytoplasme et acétylent les histones nouvellement traduites [261]. Les HATs nucléaires sont classées en trois familles principales en fonction des ressemblances fonctionnelles et structurelles des domaines catalytiques : GNAT, MYST et p300 [261]. La famille GNAT (N-acétyltransférases liées à GCN5) a trois domaines : 1) le domaine du facteur associé à P300/CBP (PCAF) avec l'activité acétyltransférase ; 2) le domaine d'interaction pour la protéine adénosine désaminase 2 (ADA2) présente dans le complexe GNAT et 3) un bromodomaine pour la reconnaissance des résidus acétyl-lysine [279].

L'inhibiteur de HAT, le composé BF1, provoque une diminution de niveau d'acétylation de la lysine 18 de l'histone 3 (H3) (H3K18) dans les lignées cellulaires du neuroblastome et diminue la prolifération cellulaire [280]. D'autres inhibiteurs de HAT, PU139 (un pan-inhibiteur de HAT) et

PU141 (inhibiteur sélectif de CBP et p300), entraînent aussi une réduction de la croissance cellulaire *in vitro* et *in vivo* [281]. De plus, le PU139 démontre une synergie avec la doxorubicine, un composé de chimiothérapie [281].

3.2.2 Désacétylation des histones

L'acétylation des histones n'est pas statique et l'effet des HATs est inversé par les histones désacétylases (HDAC) qui catalysent l'élimination du groupe acétyle des résidus de lysine sur les histones, ce qui donne lieu à une chromatine compacte et une répression transcriptionnelle [261]. Les membres de la famille HDAC de classe I, HDAC1, 2, 3 et 8, sont localisés surtout dans le noyau et exprimés dans tous les tissus [261]. HDAC1 et HDAC2 ont des structures très semblables et désacétylent les résidus de lysine sur les histones (H2A, H2B, H3 et H4) ; HDAC1 fait partie du complexe BRG1-RB1-HDAC1, mais HDAC2 fait partie du complexe RCOR/GFI/KDM1A/HDAC [261].

Plusieurs études semblent montrer le potentiel des inhibiteurs de HDACs seuls ou en tant que traitement combinatoire pour le neuroblastome. Les HDACs (HDAC2, SIRT1/2) sont régulés à la hausse par MYCN, favorisant la stabilité et l'expression de la protéine MYCN [282]. L'expression des HDACs pourrait être utilisée pour la classification des patients : l'expression de HDAC8/10 corrèle avec une survie globale faible et l'inhibition de HDAC8 *in vitro* et *in vivo* diminue la prolifération et induit la différenciation [283]. Le traitement avec un inhibiteur de HDAC, l'acide valproïque, inhibe aussi la prolifération cellulaire et induit l'apoptose et la différenciation dans les cellules de neuroblastome [284].

Le vorinostat bloque le cycle cellulaire en phase G2/M et active la voie apoptotique, même dans les lignées cellulaires MYCN amplifiées [285]. Le traitement de vorinostat combiné avec les thérapies conventionnelles de chimiothérapie ou de radiothérapie, montre des effets synergiques [148]. Les essais cliniques de phase II pour utiliser le vorinostat chez les patients atteints du neuroblastome sont en cours (NCT02559778).

3.2.3 Méthylation des histones

L'histone méthyltransférase (HMT) catalyse le transfert de méthyle de l'adénosyl-méthionine, produisant trois produits méthylés et l'adénosylhomocystéine [261]. Les résidus lysine 4, 9, 27, 36 de l'histone H3 et le résidu 20 de l'histone H4 sont souvent méthylés [261]. Les résidus lysine peuvent accepter un, deux ou trois résidus méthyle [260]. La méthylation des histones peut affecter la transcription positivement ou négativement, dépendamment de la position du résidu modifié dans la queue de l'histone : H3K4, H3K36 et H3K79 sont associés à l'activation, alors que H3K9, H3K27 et H4K20 sont plutôt associés à la répression des gènes [258].

Parmi les HMTs impliquées dans le neuroblastome sont : 1) l'EZH2 (*Enhancer of Zeste Homolog 2*), une méthyltransférase hautement conservée, est impliquée dans la mono-, di- ou tri-méthylation de H3K27 (une marque transcriptionnelle répressive) ; 2) l'EHMT2 (histone-lysine N-méthyltransférase 2 euchromatique) (ou G9a) catalyse la méthylation de H3K9, associée à la répression de la chromatine et le recrutement de la protéine hétérochromatine 1 (HP1) [261]. EZH2 est surexprimé dans le cancer MYCN amplifié : MYCN se lie sur le promoteur EZH2 *in vitro* et *in vivo* et entraîne son expression [217]. Le tazemetostat inhibe EZH2 réduit la prolifération, mais son surexpression favorise l'état indifférencié et est associée à un mauvais pronostic [286]. L'EHMT2 corrèle avec une survie faible, mais son inhibition par BIX-01294 diminue la prolifération cellulaire, induit l'apoptose et la réexpression de gènes suppresseurs de tumeurs [287].

3.2.4 Déméthylation des histones

La déméthylation des résidus lysine sur les protéines histones est réalisée par deux familles avec des mécanismes enzymatiques distincts : 1) la déméthylase spécifique de la lysine (LSD) utilise les amines oxydases dépendantes de la flavine adénine dinucléotide (FAD) et sa capacité est limitée à mono- et di-déméthylation ; 2) le Jumonji, peut déméthyliser les trois états de méthylation sur les résidus de lysine en utilisant le co-substrat 2-oxoglutarate et le dioxygène avec le Fe(II) comme cofacteur [261, 288]. Dans le neuroblastome, la surexpression de l'histone déméthylase LSD1 (KDM1A) se caractérise par un mauvais pronostic et les cellules peu différenciées et l'inhibition de LSD1 diminue la croissance tumorale dans le modèle murin [277].

Hypothèse et objectifs

La culture conventionnelle en 2D n'est pas représentative du contexte tumoral retrouvé chez les patients, incluant le phénotype cellulaire, le transcriptome et l'épigénome. Nous faisons l'hypothèse que la transition de la culture 2D vers la culture 3D va induire une phase d'adaptation cellulaire. Nous pensons que ce nouveau microenvironnement va induire des changements transcriptionnels, épigénétiques et phénotypiques qui vont induire un processus de maturation conduisant à un rapprochement du phénotype *in situ* dans le but de découvrir des médicaments potentiellement plus actifs contre le neuroblastome que ceux déjà utilisés en clinique.

Pour tester cette hypothèse, nous allons tout d'abord développer un nouveau modèle de culture cellulaire en 3D avec plusieurs lignées humaines de neuroblastome (SK-N-AS, IMR-32 et IGR-N-91). Notre modèle permettra une culture cellulaire de sphéroïdes à long terme (âgés de plusieurs semaines) avec un haut taux de viabilité, ce qui est nécessaire pour atteindre les deux prochains objectifs.

À l'aide de ce modèle, nous allons mesurer le changement d'expression des différents régulateurs épigénétiques en 3D dans le temps pour les lignées cellulaires SK-N-AS, IMR-32 et IGR-N-91 pour identifier le moment de culture cellulaire où l'épigénome des sphéroïdes commence à ressembler à l'épigénome du neuroblastome *in situ*. Les régulateurs épigénétiques à l'étude dans ce projet sont surtout ceux qui corrélaient avec un mauvais pronostic chez les patients. Ils sont donc importants dans la progression du neuroblastome et constituent des cibles potentielles pour le traitement. Nous poursuivrons cette caractérisation avec une analyse transcriptomique des cellules de neuroblastome issues de culture en 2D et en 3D.

Finalement, nous allons cribler 181 composés épigénétiques sur les cellules en 2D et les sphéroïdes des lignées cellulaires SK-N-AS et IMR-32 au moment choisi dans l'objectif précédent. Nous nous attendons alors à une différence dans la sensibilité entre la culture en 2D et la culture en 3D, ce qui serait en accord avec notre hypothèse générale. Les composés les plus efficaces en 3D dans les deux lignées seront retenus pour l'étude subséquente (ex : la courbe dose-réponse, le mécanisme d'action, etc).

Matériels et méthodes

Culture cellulaire

Culture cellulaire en 2D : La lignée de neuroblastome IGR-N-91 a été généreusement offerte par le laboratoire du Dr. Michel Duval (Centre de recherche du CHU Sainte-Justine). Les lignées IMR-32 (CCL-127) et SK-N-AS (CRL-2137) ont été achetées chez l'ATCC.

Les lignées SK-N-AS, IMR-32 et IGR-N-91 ont été cultivées dans du DMEM, EMEM et mélange DMEM/F12K 1:1 respectivement, supplémentés avec 10% de FBS. Tous les milieux et le FBS proviennent de Wisent Bioproducts. Les lignées ont été cultivées dans un incubateur humidifié avec 5% CO₂ à 37 °C. Les cellules ont été passées lorsque la confluence atteignait 70-80%, mises à une densité constante et régulièrement contrôlées pour l'infection à mycoplasmes.

Culture cellulaire en 3D des lignées SK-N-AS et IMR-32 : Pour passer de la culture en 2D à la culture en 3D, les cellules 2D ont étéensemencées à 20 000 cellules/puits dans une plaque 96 puits en forme de U (PrimeSurface 3D culture : Ultra-low Attachment Plate, S-BIO). Pour la formation de sphéroïde, les cellules ont été centrifugées à 1000 rpm pendant 5 min. Après 3 jours, les sphéroïdes ont été récoltés, centrifugés et incubés avec de la trypsine-EDTA 0,25% (Gibco) pendant 10-20 min. Les cellules isolées sont centrifugées afin d'enlever les cellules mortes, puis réensemencées pour former des nouveaux sphéroïdes à la même densité que précédemment après la centrifugation. Ensuite, le passage de sphéroïdes se fait une fois par semaine (aux jours 10, 17, 24, 31 depuis la mise en 3D).

Les temps de doublement en 2D et en 3D ont été calculés après un comptage cellulaire au microscope à l'aide de l'hémacytomètre selon la formule suivante : $(t1 - t0) \times \frac{\ln(2)}{\ln(Nt1/Nt0)}$ où t0 est le temps de début de culture (h) ; t1 est le temps de fin de culture (h) ; Nt0 est le nombre de cellules au t0 et Nt1 est le nombre de cellules au t1. Les diamètres de cellules en 2D et des cellules provenant des sphéroïdes ont été mesurés à l'aide d'ORFLO MOXI Mini Automated Cell Counter suite à leur trypsinisation.

Culture en 3D des lignées de neuroblastome, SK-N-DZ et SK-N-SH : Les lignées SK-N-DZ et SK-N-SH (tableau VIII) ont été testées, mais n’ont pas produit de modèles 3D efficaces et fonctionnels avec notre protocole. En effet, dès la première trypsine (jour 3), les sphéroïdes de SK-N-DZ étaient résistants à la trypsinisation. Donc, il était impossible d’atteindre une culture de sphéroïdes à long terme avec cette lignée. Les sphéroïdes de SK-N-SH étaient de très petite taille comparativement aux sphéroïdes des autres lignées et peu visibles à l’œil nu. De plus, les cellules de cette lignée ne se divisaient presque pas lorsque mises en sphéroïdes. Ainsi, leur temps de doublement était très grand, ce qui rendait la culture à long terme difficile.

Tableau VIII. Description des lignées cellulaires de neuroblastome utilisées pour le développement de la culture en 3D.

Lignée cellulaire	Sexe	Âge	Dérivation	Statut du gène MYCN
SK-N-DZ	Femme	2 ans	Métastase de la moelle osseuse d’un patient avec le neuroblastome peu différencié	Amplifié (130,2 ± 2,0 copies) [289]
SK-N-SH	Femme	4 ans	Métastase de la moelle osseuse	Non amplifié (2 copies) [290]

Imagerie de prolifération des cellules en 2D et des sphéroïdes

Les images des cellules en 2D et des plaques avec les sphéroïdes ont été prises à l’aide d’IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System en utilisant l’objectif 4X. Pour suivre la compaction des sphéroïdes en temps réel, des photos ont été prises toutes les 12 h pendant 23 jours pour la lignée IGR-N-91 et toutes les 12 h pendant 6,5 jours pour l’ensemble des 3 lignées cellulaires. Les données des aires ont ensuite été extraites. Pour suivre la prolifération et la viabilité des cellules en 2D et des sphéroïdes après 72 h de traitement avec les composés épigénétiques, des photos des puits traités et des puits contrôles ont été prises juste avant de mesurer la viabilité cellulaire avec le cytomètre en flux Guava (voir plus bas).

Analyse des protéines et des marques d'histones par immunobuvardage de type Western

Les cellules en 2D et en 3D à différents moments (jours 3, 10, 17, 24, 31) ont été récoltées, trypsinisées, centrifugées et rincées avec le PBS sans calcium (Wisent Bioproducts). Pour l'extraction des protéines, les culots cellulaires ont été lysés sur glace pendant 30 min dans le tampon de lyse (50 mM Tris-Cl pH 7,4 ; 5 mM EDTA ; 250 mM NaCl ; 50 mM NaF ; 0,1% Triton X-100 ; 0,1 mM orthovanadate de sodium (Na_3VO_4) et 1 mM PMSF), complété par les cocktails d'inhibiteurs de protéase (PIC) de Sigma-Aldrich et d'inhibiteurs de phosphatase (Phos STOP) de Roche. Le lysat a été centrifugé à 12 000 rpm pendant 10 min à 4 °C et le surnageant, contenant les protéines, a été conservé à -20 °C.

Pour l'extraction des protéines d'histones, les culots cellulaires ont été lysés dans du TEB froid (0,5% Triton ; 2 mM PMSF ; 0,02% NaN_3 ; 10 mM sodium butyrate), complété par les cocktails d'inhibiteurs de protéase (PIC) de Sigma-Aldrich et d'inhibiteurs de phosphatase (Phos STOP) de Roche. Le reste des étapes d'extraction a été effectué selon le protocole Abcam et le surnageant, contenant les protéines d'histones, a été conservé à -20 °C.

Les extraits ont été séparés par SDS-PAGE et transférés sur une membrane en PVDF de Bio-Rad, préalablement activée au méthanol. Les membranes ont été incubées pendant la nuit à 4°C sous agitation avec la solution d'anticorps primaires (répertoriées dans les tableaux IX et X), puis avec les solutions d'anticorps secondaires de souris (Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate, #1706516, Bio-Rad) ou de lapin (Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate, #1706515, Bio-Rad).

Les protéines ont été visualisées avec la solution Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) en utilisant le système d'imagerie ImageQuant LAS 4000. Les expériences ont été réalisées en triplicata. La quantification des bandes a été réalisée à l'aide d'ImageJ.

Tableau IX. Liste des anticorps primaires utilisées pour détecter les niveaux d'expression des protéines isolées

Protéine	Compagnie	Numéro de catalogue
β-actine	Sigma-Aldrich	A2228
BRG1	Cell Signaling	49360
EHMT2 (G9a)	Active Motif	91229, 91230
EZH2	Active Motif	39934
GCN5 (KAT2A)	ABCAM	ab18381
HDAC1	Cell Signaling	5356
HDAC2	Cell Signaling	5113
MYCN	Cell Signaling	9405S
PRMT1	ABCAM	ab92299

Tableau X. Liste des anticorps primaires utilisées pour détecter les marques d'acétylation et de méthylation sur l'histone H3

Marque d'histone 3	Compagnie	Numéro de catalogue
H3	Active Motif	39763
H3K9ac	Active Motif	39917
H3K27ac	Active Motif	39134
H3ac	Active Motif	39139
H3K27me1	Active Motif	39889
H3K27me2	Active Motif	61435
H3K27me3	Active Motif	39155
H3K9me1	Active Motif	39887
H3K9me2	Active Motif	39753
H3K9me3	Active Motif	39765
H3R2me2a (asymétrique)	ABCAM	ab194706

Criblage de 181 composés épigénétiques (lignées SK-N-AS et IMR-32)

Les composés APTSTAT3-9R, blasticidine S, proxarbazine, daptomycine, mizoribine, carboplatine, nedaplatine, gemcitabine et cytarabine ont été dissous dans l'eau, tandis que tous les autres composés ont été dissous dans le 100% DMSO (Sigma-Aldrich). Tous les composés épigénétiques ont été conservés à -80 °C.

Criblage en 2D : Les cellules des lignées SK-N-AS et IMR-32 ont étéensemencées à 10 000 cellules/puits dans des plaques 96 puits à fond plat Sarstedt. Après quelques jours, le milieu a été changé et les cellules ont été traitées avec de 181 médicaments de la banque épigénétique SelleckChem (Epigenetics Compound Library (96-well)-Z203065-100 µl-L1900) pendant 72 h à 10 µM sans ajouts de composés ou changement de milieu. Chaque plaque contenait des puits contrôles avec le DMSO ou l'eau pour évaluer leurs effets individuels sur les cellules. Ensuite, la viabilité cellulaire a été mesurée comme suit en utilisant Viacount (Luminex, 4000-0040) sur le cytomètre en flux Guava (Millipore). Les milieux de chaque puits (contenant les débris et les cellules mortes en suspension) ont été collectés et mis de côté pour plus tard, les cellules ont été rincées avec 200 µl de PBS sans calcium (Wisent Bioproducts) et incubées avec la trypsine-EDTA 0,25% (Gibco) pendant 10 min à 37°C. Les milieux de chaque puits ont été ajoutés pour arrêter la trypsinisation et mélangés soigneusement avec une pipette automatisée à 96 puits Integra. Comme suggéré par les directives du fabricant, 25 µl de la solution Viacount a été ajoutée à chaque puits et mélangée. Après l'incubation (5 min à température ambiante, dans l'obscurité), la viabilité cellulaire a été analysée sur le cytomètre en flux Guava. Les viabilités obtenues pour tous les composés ont été ajustées par rapport aux puits contrôles mentionnés ci-haut selon l'équation suivante : (viabilité du composé × 100) / viabilité moyenne des puits contrôles.

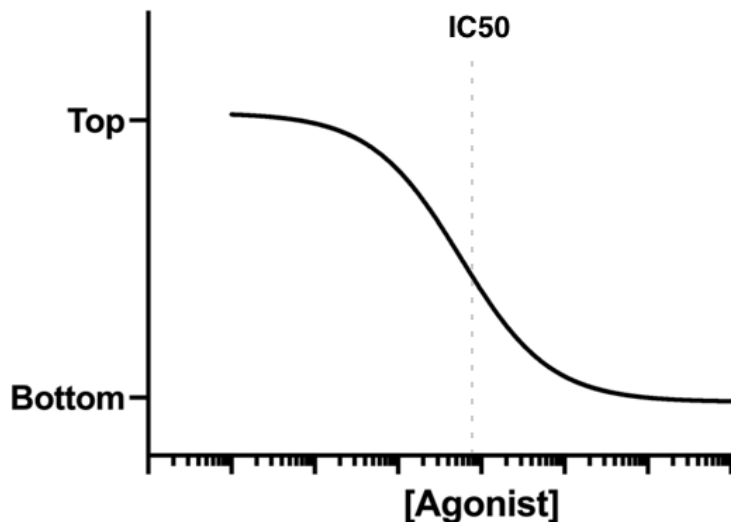
Criblage en 3D, jour 24 : Au jour 17 de culture cellulaire, les sphéroïdes ont été passés à 20 000 cellules/puits tel que décrit précédemment. Quatre jours après (jour 21 depuis la mise des cellules en 3D), le milieu des sphéroïdes a été changé, puis ils étaient traités de manière semblable aux cellules en 2D (pendant 72 h sans ajouts de composés ou changement de milieu ; 10 µM). Par contre, pour les mesures de viabilité, l'incubation avec la trypsine-EDTA 0,25% durait plus longtemps (15-20 min).

Courbes de dose-réponse

Agents de chimiothérapie : L'oxaliplatine (Toronto Research Chemicals) a été dissoute à une concentration de 10 mM dans de l'eau et le cisplatine (Toronto Research Chemicals) à une concentration de 2 mM dans le 100% DMSO (Sigma-Aldrich). Ils ont été conservés à -20 °C.

Composés épigénétiques sélectionnés suite au criblage de librairie épigénétique : L'acide ellagique (Sigma-Aldrich), l'acide valproïque (Sigma-Aldrich), l'ofloxacine (Cayman Chemical), le S-Ruxolitinib (Selleckchem) et l'E11 (Selleckchem) ont été tous dissous dans le 100% DMSO (Sigma-Aldrich) et conservés à -80 °C. Les viabilités cellulaires en 2D et en 3D ont été effectuées de la même manière que lors du criblage (décrit ci-haut).

Calcul de l'IC50 : L'IC50 est la concentration de composé ou de médicament produisant une réponse à mi-chemin entre les niveaux de réponse inférieur (*Bottom*) et supérieur (*Top*).



Les valeurs d'IC50 ont été calculées à l'aide du modèle « Dose-réponse – Inhibition » intégré dans le logiciel GraphPad Prism en utilisant l'équation « [Inhibiteur] vs réponse - Pente variable (quatre paramètres) » et la formule suivante :

$$y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + (\text{IC50}/x)^{\text{Hill Slope}}} \quad \text{où}$$

Bottom désigne la valeur de y du plateau minimal (théoriquement, le niveau de réponse obtenu en absence de traitement avec le composé) ; *Top* désigne la valeur de y du plateau maximal (théoriquement, le niveau de réponse obtenu après traitement avec la concentration infiniment élevée de composé) ; *Hill Slope* décrit la pente d'une courbe dose-réponse et représente la

sensibilité à l'augmentation de concentration de composé. *Hill Slope* de -1 est standard et *Hill Slope* plus négatif que -1 (par exemple, -2) est plus raide. Adapté de H. J. Motulsky, "Equation: [Inhibitor] vs. response -- Variable slope", *GraphPad Curve Fitting Guide*. Consulté le 2 avril 2022. https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/curve-fitting/reg_dr_inhibit_variable_2.htm

Extraction et séquençage d'ARN

Les lysats cellulaires ont été homogénéisés grâce à QIAshredder (numéro de catalogue : 79654) pour augmenter les rendements d'ARN. Par la suite, l'ARN total a été extrait avec RNeasy Mini Kit (numéro de catalogue : 74104) selon le protocole du fabricant. La concentration et la pureté (ratio 260/280) de l'ARN ont été mesurées avec le spectrophotomètre NanoDrop 1000 de Thermo Fisher Scientific. Le séquençage d'ARN (RNA-Seq) a été réalisé en utilisant le type de séquençage Illumina NovaSeq 6000 S4 PE100 - 25M lectures (type de librairie : mRNA Stranded) par Génome Québec.

Analyses statistiques

L'ANOVA à deux facteurs a été utilisée pour l'analyse statistique et la valeur P a été évaluée par le test de comparaison multiple de Dunnett. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative avec un intervalle de confiance de 95%. Les statistiques et les graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism.

Résultats

Lignées cellulaires de neuroblastome

Le modèle de culture en 3D a été développé pour plusieurs lignées de neuroblastome. Tel que montré dans le tableau XI, les trois lignées utilisées se différencient tout d'abord au niveau du sexe, de l'âge du patient et du site de leur provenance, mais la différence caractéristique et importante se trouve au niveau du statut de MYCN.

En effet, la lignée cellulaire SK-N-AS n'a pas d'amplification de l'oncogène MYCN et contient deux copies de MYCN. Par contre, les lignées IMR-32 et IGR-N-91 sont MYCN amplifiées, mais IGR-N-91 contient plus de copies de MYCN (350 copies) que la lignée IMR-32 (86.0 ± 6.4 copies) [289, 290]. Ceci est en accord avec le fait que IGR-N-91 provient du patient avec le neuroblastome à haut risque (stade 4) après un échec de chimiothérapie adriamycine-vincristine.

Tableau XI. Les lignées cellulaires de neuroblastome utilisées pour le développement et la caractérisation de la culture en 3D.

Lignée cellulaire	Sexe	Âge	Dérivation	Statut du gène MYCN
SK-N-AS	Femme	6 ans	Métastase de la moelle osseuse d'un patient avec le neuroblastome peu différencié	Non amplifié
IMR-32	Homme	13 mois	Masse abdominale diagnostiquée comme neuroblastome avec de rares zones de différenciation	Amplifié
IGR-N-91	Homme	8 ans	Moelle osseuse infiltrée prélevée sur le neuroblastome à haut risque (stade 4) appartenant à un patient après l'échec d'une chimiothérapie adriamycine-vincristine	Amplifié

Mise au point et caractérisation du modèle de culture cellulaire en 3D avec la lignée IGR-N-91

Pour mettre au point le modèle de culture de sphéroïdes, les expériences de temps de doublement et de viabilité ont été répétées avec deux meilleurs milieux de culture choisis d'après la figure S1 en annexe (DMEM et DMEM/F12K 1 : 1). Le milieu semble ne pas affecter le temps de doublement : pour les deux milieux, ce-dernier se situe à ~55 h en 2D, puis il augmente à ~75 h et ~110 h aux jours 3 et 10 de culture en 3D respectivement et se stabilise finalement autour de 100 h pour les jours 17, 24, 31, 38 et 45 (Figure 11A). En ce qui concerne la viabilité, elle ne varie pas beaucoup selon le milieu en 2D (~80%) et aux jours 6 (75%), 13 (70%) et 20 (60%), mais le milieu DMEM/F12K 1 : 1 semble être plus efficace pour la culture en 3D à long terme (Figure 11B). En effet, les viabilités aux jours 27, 34 et 41 sont de 59%, 56% et 47% respectivement pour le milieu DMEM, tandis qu'elles sont plus élevées et plus stables pour le milieu DMEM/F12K 1 : 1 (69%, 64% et 68%).

Les diamètres des cellules en 2D et des cellules qui font partie du sphéroïde ont été mesurés et il a été trouvé que le milieu de culture n'influence pas le diamètre de cellules (Figure 11C). Par contre, le diamètre semble varier légèrement selon le type de culture : il se situe autour de 14 μm en 2D, de ~13,5 μm au jour 3 de culture en 3D et se stabilise autour de 13 μm pour les jours 10, 17, 24 et 31.

La compaction des sphéroïdes avec les deux milieux a été suivi en temps réel par les mesures régulières des aires des sphéroïdes et il a été vu que le milieu de culture n'influence pas la formation et la croissance du sphéroïde dans le temps (Figure 11D). En effet, seulement 24 h après la centrifugation des cellules dans la plaque en forme de U, le sphéroïde est déjà compacté et formé. Par la suite, jusqu'à son prochain passage (dans une semaine), le sphéroïde est en croissance et ce, surtout dans les 3-4 derniers jours précédant le passage. Alors, suite à ces expériences, le milieu DMEM/F12K 1 : 1 est sélectionné pour la culture cellulaire de la lignée IGR-N-91 en 2D et en 3D.

Les milieux EMEM, DMEM ont été testés de manière semblable pour les lignées SK-N-AS et IMR-32 (données non montrées), mais il n'y a pas eu de différence ni dans les temps de

doublement, ni dans les viabilités en 3D. Alors, les milieux suggérés par ATCC ont été utilisés : le DMEM pour les SK-N-AS et l'EMEM pour les IMR-32 (supplémentés avec 10% FBS).

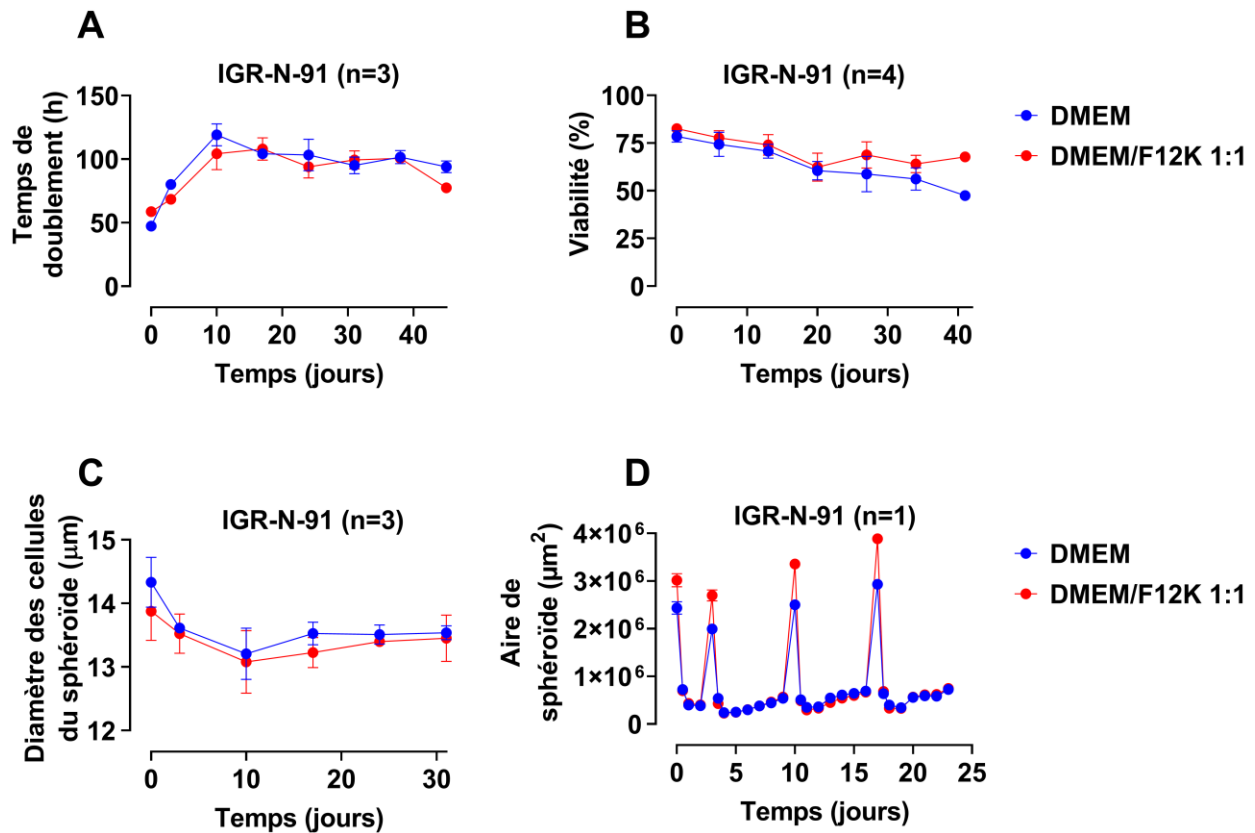


Figure 11. Mise au point et caractérisation du modèle de culture des sphéroïdes de la lignée cellulaire IGR-N-91.

A. Le temps de doublement des cellules de IGR-N-91 a été mesuré en 2D (jour 0) et lors des passages d'une plaque de 96 sphéroïdes (jours 3, 10, 17, 24, 31, 38 et 45) pour les deux milieux (n=3). **B.** La viabilité des cellules de IGR-N-91 a été mesurée en 2D (jour 0) et 3 jours après la formation de 24 sphéroïdes (jours 6, 13, 20, 27, 34 et 41) par le cytomètre en flux Guava pour les deux milieux (n=4). **C.** Le diamètre des cellules composant le sphéroïde a été mesuré en 2D (jour 0) et lors des passages des sphéroïdes (jours 3, 10, 17, 24 et 31) à l'aide d'ORFLO MOXI Mini Automated Cell Counter pour les deux milieux (n=3). **D.** La compaction et la croissance cellulaire ont été suivies en temps réel par les mesures d'aire de sphéroïde à toutes les 12 h pendant 23 jours avec IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System pour les deux milieux (n=1 ; plusieurs sphéroïdes par milieu).

Caractérisation des trois nouveaux modèles de culture en 3D

Par la suite, les trois lignées cellulaires du neuroblastome ont été caractérisées en 2D et en 3D. En ce qui concerne le temps de doublement, il semble varier de manière semblable pour les trois modèles en 3D : d'abord, il est de ~20 h, ~38 h et ~59 h en 2D pour les lignées IMR-32, SK-N-AS et IGR-N-91 respectivement, puis il augmente jusqu'à près de 80 h au jour 3 de culture en 3D et se stabilise finalement entre 100 et 140 h pour les jours 10, 17 et 24 (Figure 12A). Il est possible de noter en observant les courbes de temps de doublement des trois lignées que la lignée IGR-N-91 possède le plus grand temps de doublement en 2D, mais les sphéroïdes de cette lignée prolifèrent le plus rapidement.

La viabilité est aussi semblable pour les trois modèles en 3D : elle est de 83%, 89% et 95% pour les lignées IGR-N-91, SK-N-AS et IMR-32 respectivement, puis elle varie entre 70% et 85% pour les trois lignées aux jours 6, 13, 20, 27 et 34 (Figure 12B). Des trois modèles de culture, la lignée IGR-N-91 a la plus faible viabilité, tandis que la lignée IMR-32 possède la meilleure viabilité.

Comme dans l'expérience avec la lignée IGR-N-91, un jour après la centrifugation, les cellules se compactent pour former un sphéroïde pour les deux autres lignées (Figure 12C). Par la suite, l'aire des sphéroïdes semble être constante pour les trois premiers jours après sa formation et le sphéroïde semble être en croissance dans les 3-4 jours suivants (jours précédant le passage du sphéroïde). D'après les courbes des aires, les sphéroïdes de la lignée IMR-32 semblent être les plus petits, suivis par ceux de la lignée SK-N-AS. Cependant, les sphéroïdes de la lignée IGR-N-91 semblent avoir la plus grande taille. Ces observations ont été confirmées avec les photos des sphéroïdes prises en temps réel (Figure 12D, jour 6).

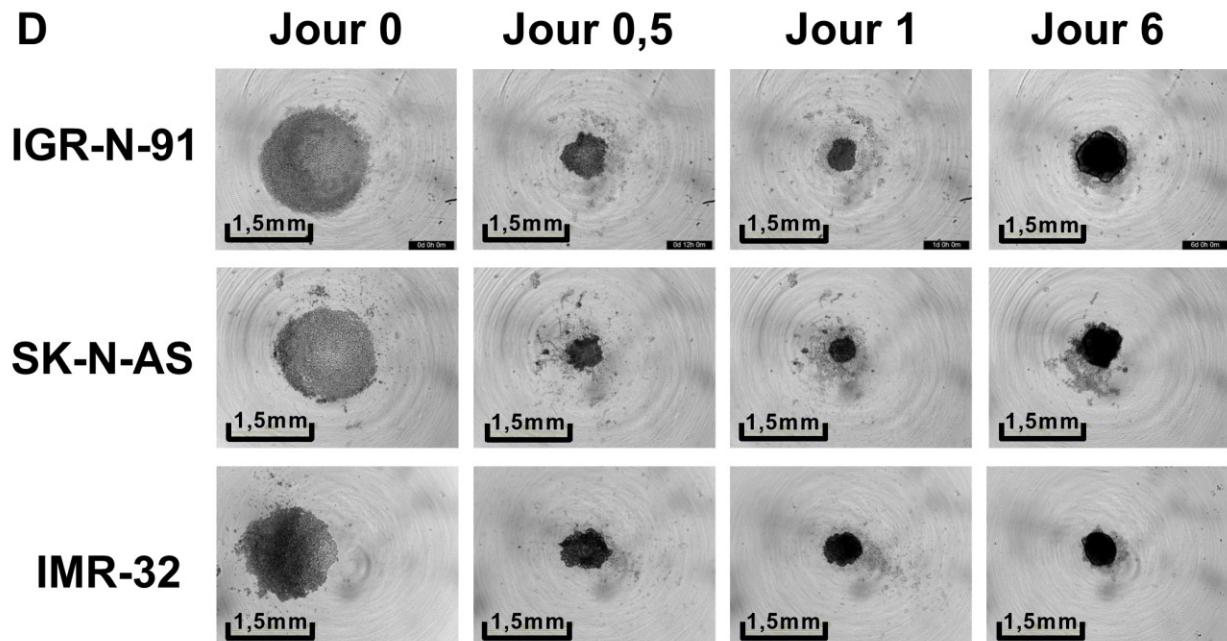
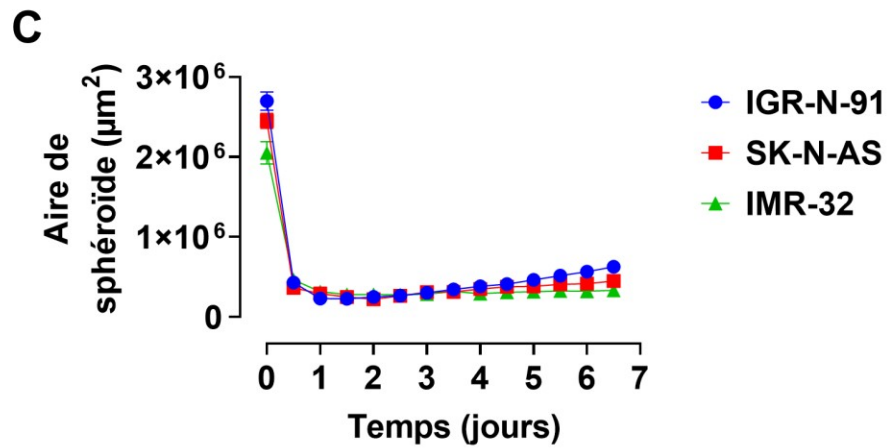
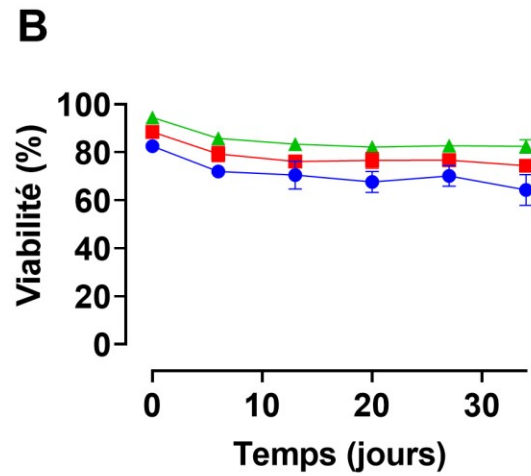
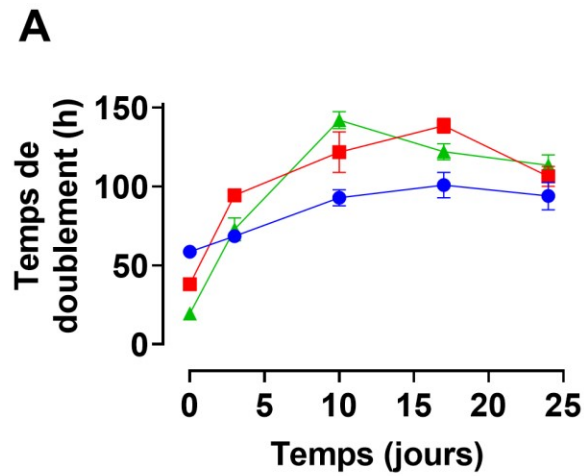


Figure 12 : Caractérisation des trois modèles de culture en 3D : IGR-N-91, SK-N-AS et IMR-32.

A. Le temps de doublement de cellules des trois lignées a été mesuré en 2D (jour 0) et lors des passages des sphéroïdes (jours 3, 10, 17, 24) (n=3). **B.** La viabilité des cellules de IGR-N-91 a été mesurée en 2D (jour 0) et 3 jours après la formation des sphéroïdes (jours 6, 13, 20, 27 et 34) par le cytomètre en flux Guava (n=3). **C.** La compaction et la croissance ont été suivies en temps réel par les mesures d'aire de sphéroïde à toutes les 12 h pendant 6,5 jours avec IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System (n=1 ; plusieurs sphéroïdes pour chaque milieu). **D.** Photos des sphéroïdes aux jours 0 ; 0,5 ; 1 et 6.

Expression des régulateurs épigénétiques ayant une incidence clinique chez le patient et la progression du neuroblastome pédiatrique

Tel que mentionné dans l'introduction, la surexpression de certains régulateurs épigénétiques (MYCN, EZH2, HDAC, EHMT2, BRG1) corrèle avec le mauvais pronostic chez le patient [283, 291-294]. Pour cette raison, nous avons décidé d'analyser leur expression en 2D et en 3D à différents moments de culture de sphéroïdes par Western Blot (Figure 13A). Ceci permettra de vérifier notre hypothèse qui suppose que la culture en 3D permet mieux mimer l'environnement tumoral et s'approcher donc du phénotype cancéreux retrouvé chez le patient.

L'expression des protéines en 3D a été normalisée par rapport au niveau d'expression en 2D. Pour la lignée MYCN amplifiée, IMR-32, l'expression de tous les régulateurs augmente jusqu'à 1,5-2 fois (sauf PRMT1) et certains régulateurs (les HDACs, BRG1, EHMT2) sont surexprimés significativement dans la culture du sphéroïde à long terme (jours 17, 24, 31) (Figure 13B). Pour la lignée MYCN non amplifiée, SK-N-AS, l'expression des régulateurs HDAC2 et BRG1 augmente jusqu'à ~1,7 fois, tandis que GCN5 et HDAC1 sont surexprimés 4-5 fois pour la culture à long terme (jours 17, 24, 31) et un peu moins (2-4 fois) pour la culture à court terme (jours 3, 10) (Figure 13C). Par contre, l'expression des protéines EZH2 et PRMT1 est invariable dans le temps. Pour la lignée MYCN amplifiée, IGR-N-91, tous les régulateurs ne varient pas entre la culture en 2D et en 3D et sont exprimés de façon constitutive (sauf BRG1, surexprimé jusqu'à 1,8 fois dans les cultures en 3D à court et à long terme) (Figure 13D). Suite à l'analyse de plusieurs régulateurs épigénétiques, nos modèles de culture développés semblent s'approcher du neuroblastome *in situ*.

Ainsi, les prochaines expériences de ce mémoire seront performées avec seulement deux modèles en 3D : IMR-32 et SK-N-AS. Le modèle avec la lignée IGR-N-91 est moins pertinent parce qu'il y a seulement un régulateur épigénétique qui varie dans le temps en 3D. De plus, ce modèle provient d'un patient déjà traité par la chimiothérapie et possède la plus basse viabilité en 3D des trois lignées (Figure 12B), ce qui est problématique pour le criblage de composés épigénétiques. D'après la figure 13 B et C, la culture en 3D à long terme (jour 24) a été choisie pour les expériences avec les composés pharmacologiques.

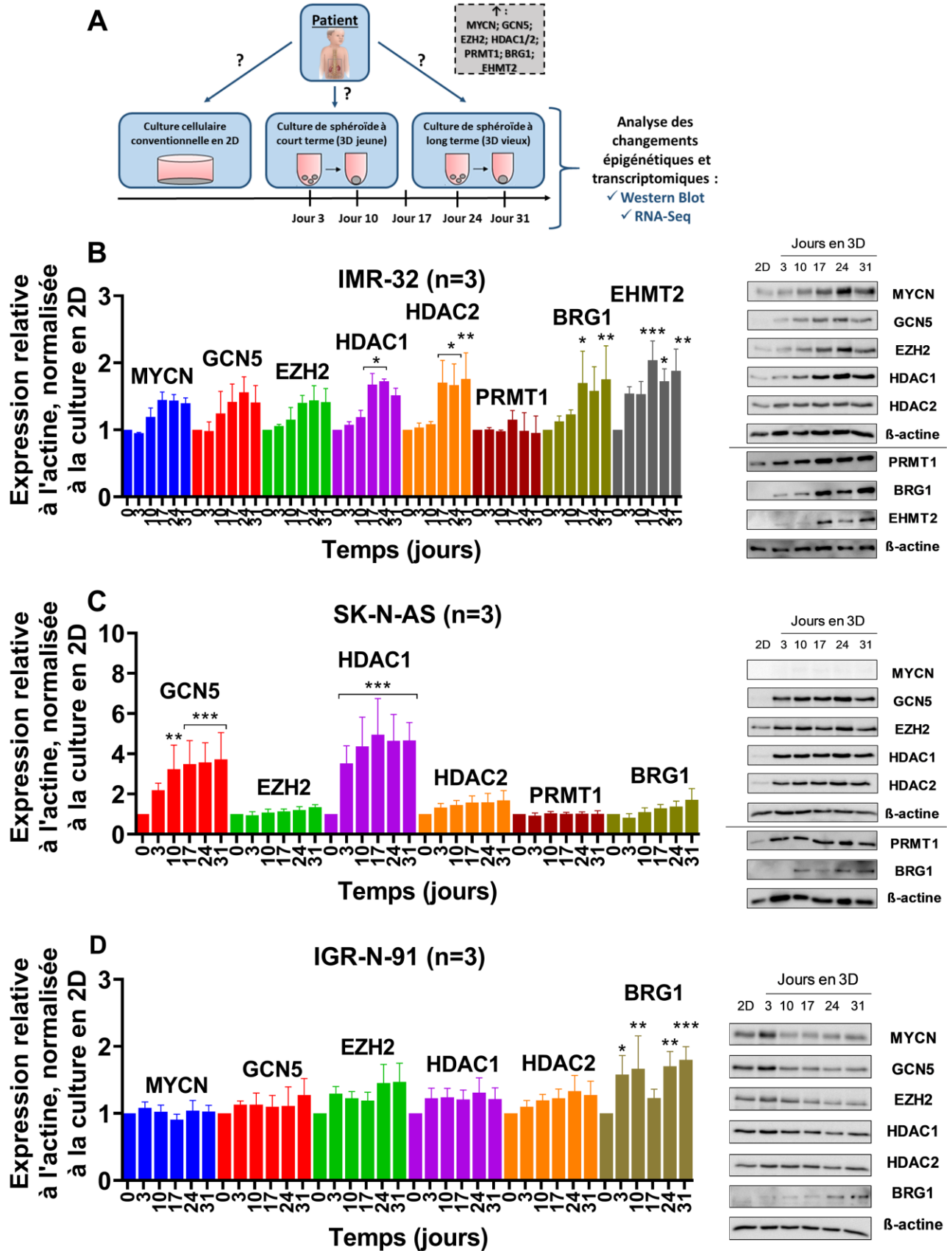


Figure 13. Quantification en 2D et en 3D des changements d'expression de plusieurs régulateurs épigénétiques importants pour le pronostic chez le patient dans les trois modèles de culture en 3D du neuroblastome.

A. Schéma résumant le rationnel de mesurer différents régulateurs épigénétiques pour la culture cellulaire en 2D et celle en 3D (à court terme et à long terme). **B.** Quantification de l'expression relative à l'actine et normalisée à la culture en 2D des régulateurs MYCN, GCN5, EZH2, HDAC 1, HDAC 2, PRMT1, BRG1 et EHMT2 dans le temps par Western Blot pour la lignée IMR-32 (n=3). **C.** Quantification de l'expression relative à l'actine et normalisée à la culture en 2D des régulateurs GCN5, EZH2, HDAC 1 et 2, PRMT1 et BRG1 dans le temps par Western Blot pour la lignée SK-N-AS (n=3). **D.** Quantification de l'expression relative à l'actine et normalisée à la culture en 2D des régulateurs MYCN, GCN5, EZH2, HDAC 1 et 2 et BRG1 dans le temps par Western Blot pour la lignée IGR-N-91 (n=3).

Expression des marques d'histone H3 associées aux régulateurs épigénétiques

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux marques d'acétylation et de méthylation sur l'histone H3 qui sont reliées aux régulateurs épigénétiques étudiés précédemment afin de voir s'il y a un lien entre les deux. L'expression de 10 marques d'histones H3 a été donc mesurée en 2D et en 3D à différents moments de culture de sphéroïdes par Western Blot. Pour les deux lignées, IMR-32 et SK-N-AS, il n'y a pas de variation significative dans l'expression des marques d'histones tant au niveau de l'acétylation qu'au niveau de la méthylation (Figure 14 et Figure S2 en annexe). Ainsi, il semble que la variation dans l'expression des régulateurs épigénétiques ne corrèle pas avec la variation globale dans les marques d'histone H3 respectives.

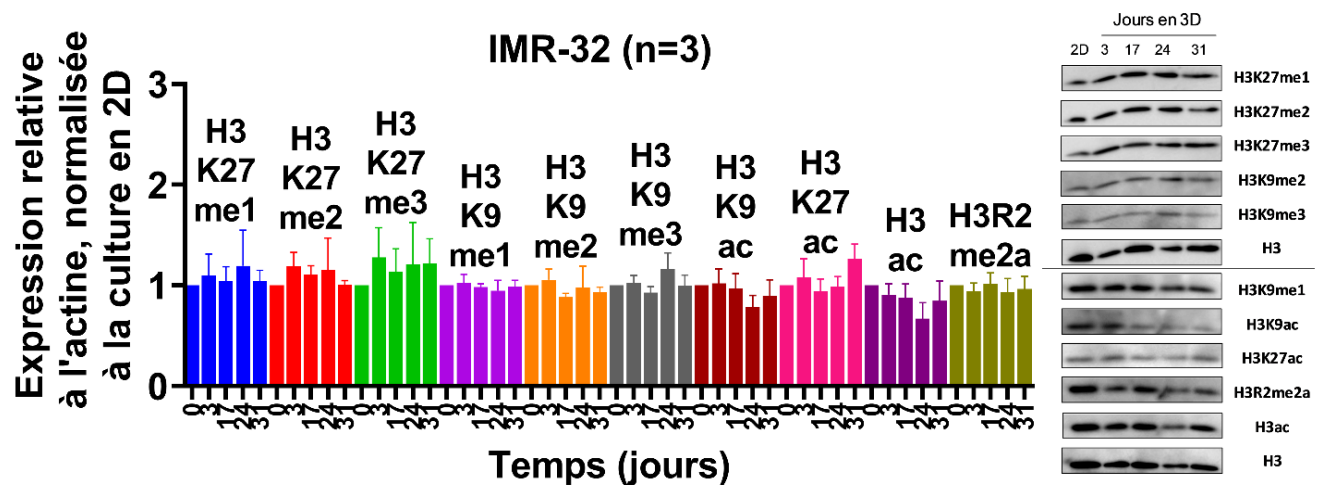


Figure 14. Quantification en 2D et en 3D des changements d'expression de plusieurs marques d'acétylation et de méthylation d'histone H3 reliées aux régulateurs épigénétiques pour le modèle en 3D avec la lignée IMR-32.

Quantification de l'expression relative à l'actine et normalisée à la culture en 2D des marques de méthylation (H3K27me1, H3K27me2, H3K27me3, H3K9me1, H3K9me2, H3K9me3, H3R2me2a) et d'acétylation (H3K9ac, H3K27ac et H3ac) de l'histone H3 dans le temps par Western Blot pour la lignée IMR-32 (n=3).

Traitement de la lignée IMR-32 avec les composés de chimiothérapie de la famille des platines en 2D vs en 3D

Plusieurs composés pharmacologiques semblent fonctionner très bien sur la culture conventionnelle en 2D, mais ne se rendent pas loin en clinique puisqu'ils ne sont pas efficaces chez le patient. Nous avons donc décidé de valider notre modèle en 3D encore une fois en traitant la lignée MYCN amplifiée IMR-32 en 2D et en 3D (jour 24) avec deux différents médicaments de la chimiothérapie de la famille des platines (cisplatine et oxaliplatine), utilisés pour traiter le neuroblastome (Tableau XII).

Les courbes de dose-réponse confirment que la culture en 2D est effectivement plus sensible au traitement que la culture de sphéroïdes. En effet, les IC50 en 2D sont de 0,5 μ M et 0,6 μ M, tandis que les IC50 en 3D sont de 2,6 μ M et 2,2 μ M pour le cisplatine et l'oxaliplatine respectivement (Figure 15). Le modèle de culture en 3D développé semble donc être plus proche de la réalité retrouvée dans le neuroblastome pédiatrique que le modèle en 2D. Cependant, les doses intra-tumorales, correspondant à 0,02 M et 0,1 M pour le cisplatine et le carboplatine respectivement, sont nettement supérieures aux concentrations utilisées pour les expériences avec les cultures cellulaires. Donc, les lignées cellulaires constituent un modèle pour étudier le cancer, mais les résultats obtenus s'éloignent des conditions cliniques.

Tableau XII. Doses circulante et intra-tumorale des deux traitements de la chimiothérapie couramment utilisés pour le neuroblastome.

	Dose circulante par cycle (mg/m ²)	Dose intra-tumorale (mg/ml)	Demi-vie
Cisplatine	100	6	D'élimination : 43 minutes Terminale : 5,4 jours
Carboplatine	375	39	D'élimination : 116 minutes Terminale : 5,8 jours

Tableau adapté de [295].

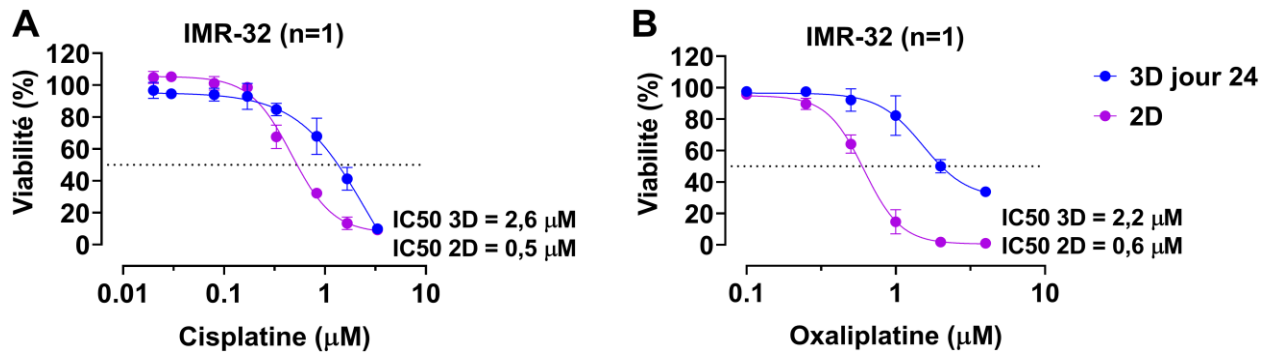


Figure 15. Traitement en 2D et en 3D de lignée cellulaire MYCN amplifiée, IMR-32, avec les composés de la chimiothérapie utilisés dans le neuroblastome pédiatrique.

A. Courbes de dose-réponse en 2D et en 3D (jour 24) suite au traitement avec le cisplatine de la lignée IMR-32 (n=1 ; 5 sphéroïdes). **B.** Courbes de dose-réponse en 2D et en 3D (jour 24) suite au traitement avec l'oxaliplatine de la lignée IMR-32 (n=1 ; 5 sphéroïdes). Les IC50 en 2D et en 3D sont indiqués.

Criblage d'une librairie de 181 composés épigénétiques

Un criblage (72 h ; 10 μ M) d'une librairie de 181 composés épigénétiques (tableau 13 et S1 en annexe) ciblant des voies de signalisation différentes a été effectué en 2D et sur les sphéroïdes de 24 jours pour les deux lignées cellulaires. La répartition des viabilités est différente selon la lignée cellulaire (Figure 16A et 16B). Nous nous intéressons surtout aux composés réussissant à tuer efficacement les cellules en 3D, mais maintiennent une bonne viabilité en 2D. Les composés qui provoquent la mort des cellules cultivées en deux types de culture, c'est-à-dire en 2D et en 3D (quadrant rouge), ne présentent pas d'intérêt particulier parce qu'ils seraient potentiellement non spécifiques et provoqueraient des effets secondaires graves pour les enfants traités. Ainsi, ces composés n'auraient pas de chance d'être approuvé en clinique et n'étaient pas étudié en détail durant mon projet.

Pour la lignée SK-N-AS, la plupart des composés (83%) ne fonctionnent pas ni en 2D, ni en 3D. Par contre, pour la lignée IMR-32, à peu près la moitié des composés (44%) n'influencent pas la viabilité. Le profil des viabilités différent selon la lignée confirme la nécessité d'avoir plusieurs modèles de culture pour tester les médicaments. Les composés d'intérêts se trouvent dans le quadrant mauve et représentent 14% et 6% des composés testés pour les lignées SK-N-AS et IMR-32 respectivement.

Un digramme de Venn a été effectué pour analyser les composés communs aux deux modèles (Figure 16C). Ils sont au nombre de 4 (Figure 16D et 16E), plus l'E11, retrouvé seulement pour les IMR-32 (tableau XIV), mais qui serait intéressant à analyser plus en profondeur car c'est l'inhibiteur d'EZH2, un des régulateurs épigénétiques analysés par Western Blot (Figure 13).

Les photos prises juste avant les mesures de viabilités sont en accord avec les mesures de viabilités (Figure 16F). En effet, pour tous les composés, les cellules en 2D ont une bonne morphologie et sont viables, tandis que le 3D contient beaucoup de débris cellulaires autour le sphéroïde.

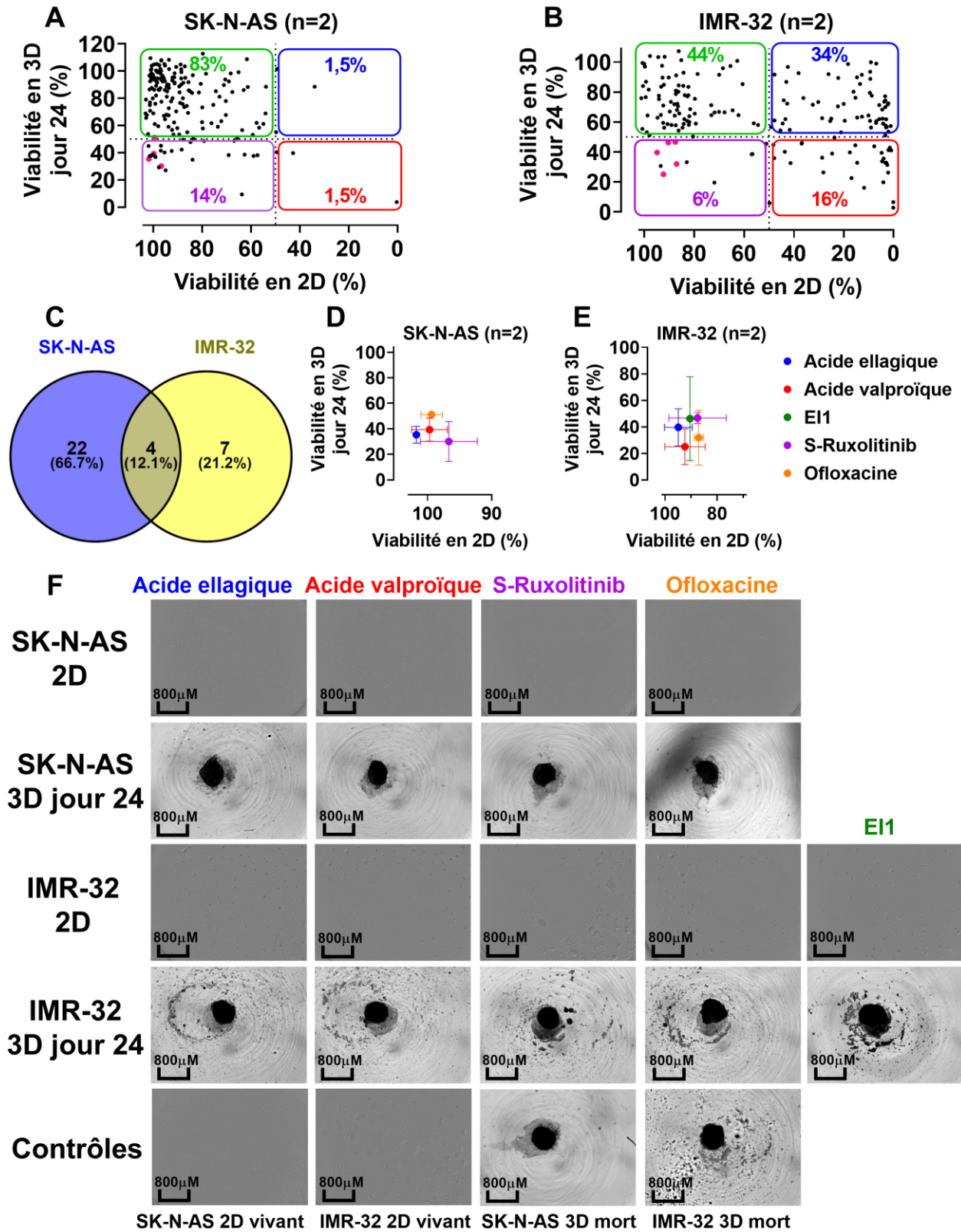


Figure 16. Criblage en 2D et en 3D de 181 composés épigénétiques sur la lignée cellulaire MYCN non amplifiée SK-N-AS et sur la lignée MYCN amplifiée IMR-32.

A. B. Les moyennes de viabilités en 2D et en 3D (jour 24) obtenues suite au criblage des composés épigénétiques de 72 h à 10 μ M pour les lignées SK-N-AS (A) et IMR-32 (B) (n=3). Dans le quadrant vert se trouvent les composés qui n'ont pas d'effet sur la viabilité ni en 2D, ni en 3D ; dans le quadrant rouge, les composés qui tuent les cellules en 2D et en 3D ; dans le quadrant bleu, les composés qui tuent efficacement les cellules en 2D, mais pas en 3D et finalement, le quadrant mauve contient les composés qui tuent les cellules en 3D, mais pas en 2D.

C. Le digramme de Venn des composés qui sont plus sensibles en 3D qu'en 2D (quadrant mauve des graphiques précédents).

D. E. Les moyennes avec les écarts-types des viabilités des 4 composés épigénétiques communs aux deux lignées (acides ellagique et valproïque, S-Ruxolitinib, ofloxacine) et l'E11 qui a été efficace seulement pour la lignée IMR-32.

F. Les photos des cellules en 2D et des sphéroïdes de 24 jours après 72 h de traitement avec les composés épigénétiques et des sphéroïdes contrôles morts prises avec IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System (objectif 4X).

Étude des composés sélectionnés après le criblage de 181 composés

Afin d'étudier les 4 composés ressortis communément aux deux lignées cellulaires de neuroblastome et l'E11, des traitements à différentes concentrations de chaque composé ont été effectués (courbes dose-réponse). D'abord, pour tous les composés et les deux lignées, on remarque avec l'allure des courbes que les cellules en 3D sont plus sensibles au traitement et que les cellules en 2D résistent beaucoup plus au traitement avec des valeurs d'IC50 plus petits en 3D qu'en 2D (Figure 17). Ceci est en accord avec le fait que les composés choisis après le criblage sont ceux qui fonctionnent bien en 3D et maintiennent une bonne viabilité en 2D.

De plus, pour certains composés, le IC50 n'a pas été atteint pour les sphéroïdes, malgré des concentrations élevées. Ceci est vrai pour tous les composés traités de la lignée SK-N-AS (sauf l'acide ellagique) et pour S-Ruxolitinib et E11 de la lignée IMR-32. Par contre, le IC50 a été atteint pour tous ces composés (sauf l'acide valproïque de la lignée SK-N-AS, pour lequel le IC50 n'a pas été atteint ni en 2D ni en 3D).

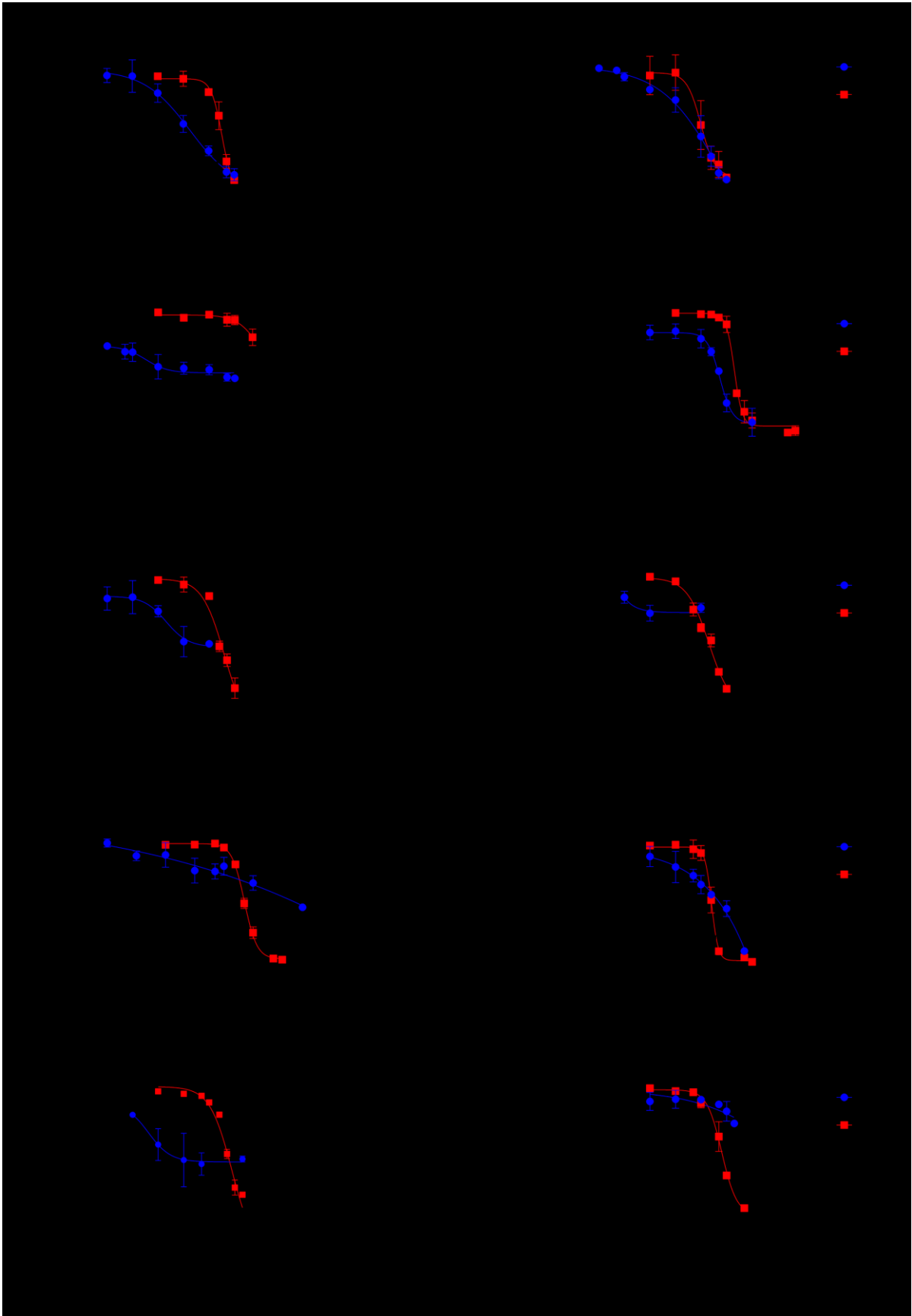


Figure 17. Courbes de dose-réponse en 2D et en 3D des 5 composés épigénétiques sélectionnés suite au criblage d'une librairie de 181 composés pour les lignées SK-N-AS et IMR-32.

A. C. E. G. I. Les viabilités en 2D et en 3D (jour 24) suite au traitement de 72 h avec différentes concentrations d'acide ellagique, acide valproïque, S-Ruxolitinib, ofloxacine et EI1 pour la lignée SK-N-AS (n=3).

B. D. F. H. J. Les viabilités en 2D et en 3D (jour 24) suite au traitement de 72 h avec différentes concentrations d'acide ellagique, acide valproïque, S-Ruxolitinib, ofloxacine et EI1 pour la lignée IMR-32 (n=3).

Tableau XIII. Répartition des 181 composés de la librairie épigénétique.

Voie de signalisation	Angiogenèse	Cycle cellulaire	Domage à l'ADN	Épigénétique	JAK/STAT
Nombre de composés	5	18	32	100	26

Tableau XIV. Les 5 composés sélectionnés pour les deux lignées de neuroblastome après le criblage d'une librairie génétique de 181 composés.

Nom du composé	Information	Cible	Voie de signalisation
Ellagic acid	Antiproliferative and antioxidant property	Topoisomerase	DNA Damage
Valproic acid	HDAC inhibitor with IC50 of 0.4 mM and also inhibits GABA-transaminase or succinic semialdehyde dehydrogenase	HDAC	Epigenetics
Ofloxacin	Synthetic broad-spectrum antimicrobial agent	Topoisomerase	DNA Damage
EI1	Potent and selective EZH2 inhibitor with IC50 of 15 nM and 13 nM for EZH2 (WT) and EZH2 (Y641F), respectively.	Histone Methyltransferase	Epigenetics
S-Ruxolitinib	First potent, selective, JAK1/2 inhibitor to enter the clinic with IC50 of 3.3 nM/2.8 nM, >130-fold selectivity for JAK1/2 versus JAK3. Phase 3.	JAK	JAK/STAT

Discussion

À cause de la facilité, la reproductibilité, la rapidité et des coûts associés moins élevés, la plupart des laboratoires de recherche dans le monde utilisent la culture conventionnelle en 2D pour étudier les mécanismes cancéreux et développer de nouveaux médicaments. Cependant, il existe des différences majeures entre la culture des cellules en 2D et en 3D et pour cette raison qu'une grande partie de ma maîtrise a été consacrée au développement et à la caractérisation d'un modèle du neuroblastome en 3D en testant plusieurs milieux de culture pour trois lignées cellulaires humaines différentes sur le plan génétique (ex : expression de *MYCN*). Selon nos objectifs et hypothèses, la culture en 3D permettra une découverte de nouveaux médicaments et mécanismes d'actions reliés à leur fonctionnement.

Effectivement, la culture en 3D a la capacité de modéliser l'environnement des cellules tumorales *in vivo*, mais tout en étant cultivée *in vitro* [296]. Plusieurs caractéristiques telles que la morphologie, la différenciation et la prolifération cellulaire, le métabolisme des composés pharmacologiques, la réponse aux stimuli, l'expression de gènes et la synthèse des protéines sont plus représentatifs dans les modèles 3D [297].

De plus, les cellules cultivées dans une flasque en monocouche ont une forme aplatie et allongée puisqu'elles ont la possibilité de se développer seulement en deux dimensions [298]. Par contre, dans une culture tridimensionnelle, la forme et la croissance naturelles sont conservées : les cellules poussent en agrégats (sphéroïdes) contenant plusieurs couches de cellules [298].

La forme des cellules influence l'exposition des cellules aux différentes composantes. Les cellules en 2D sont plus ou moins uniformément distribuées et exposées au milieu de culture, contenant les facteurs de croissance, les ajouts d'acides aminés et autres nutriments pour la prolifération, ou aux composés pharmacologiques ajoutés [299]. Ainsi, la plupart des cellules en 2D se retrouvent dans la même phase du cycle cellulaire [299]. Le système de culture en 3D mime mieux l'environnement, le comportement et la structure de cancer *in vivo* que la culture en 2D. En effet, les cellules en sphéroïdes, étant plus empaquetées, les nutriments et les médicaments ne sont pas distribués de la même manière. Les cellules se trouvant à l'extérieur échangent plus facilement les nutriments, l'oxygène et les déchets qui affectent le métabolisme cellulaire, tandis

que les cellules au centre de la culture 3D restent inactives parce qu'elles ont moins d'échanges d'oxygène et de facteurs de croissance avec l'environnement [298, 299].

Les jonctions cellulaires entre les cellules en 2D sont plus rarement retrouvées qu'en 3D et elles sont moins représentatives des jonctions réelles entre les cellules dans le corps [300]. La culture cellulaire en 3D contient plus de jonctions, permet une meilleure communication et interaction entre les cellules tumorales avec d'autres cellules favorisant ainsi l'étude et la compréhension des mécanismes et des échanges cellulaires [300]. Les cellules communiquent par les échanges d'ions et des petites molécules [297]. Aussi, les cellules en 3D sont bien différenciées par rapport aux cellules 2D [298]. De plus, le modèle cancéreux en 3D peut toujours être amélioré (ex : par l'ajout d'autres cellules, comme les cellules immunitaires T ou les NK) aux lignées de neuroblastome.

Le choix du modèle de culture cellulaire est primordial pour tester les médicaments. Les cellules en 2D sont peu résistantes aux traitements et fonctionnent bien en 2D [301]. La culture des sphéroïdes est plus résistante aux traitements, possède un meilleur métabolisme et donc, représente mieux la réponse aux médicaments et l'effet thérapeutiques des patients atteints de neuroblastome [301]. Ainsi, la culture cellulaire en 3D réduit les différences entre *in vivo* et le criblage de composés pharmacologiques *in vitro*. Ceci arrive probablement à cause de la présence de gradient de diffusion à travers le sphéroïde permettant une diffusion différentielle entre les cellules de l'intérieur et de l'extérieur du sphéroïde ou à cause que différents gènes n'ont pas la même expression en 2D et en 3D [299]. Les niveaux d'expression de gènes et de protéines en 3D ressemblent à ceux retrouvés *in vivo* [297, 298].

Finalement, la croissance cellulaire est trop rapide dans les cultures en 2D, alors que le taux de prolifération des cellules mises en sphéroïde est plus lent et représentatif de la tumeur *in situ* qui n'a pas une croissance extrêmement rapide [297, 299]. En effet, lors de la mesure des temps de doublement en 2D et en 3D pour les trois lignées cellulaires de neuroblastome, les cellules poussent plus lentement en 3D. Probablement à cause qu'elles sont plus compactes et manquent de nutriments à l'intérieur du sphéroïde, mais cette hypothèse reste à être vérifiée.

Les stratégies thérapeutiques pour traiter le neuroblastome ne sont pas optimales, possèdent des toxicités élevées et les effets secondaires indésirables. Ainsi, ce cancer pédiatrique reste l'une des principales causes de décès. La recherche de nouvelles thérapies ciblées visant à inhiber les voies de signalisation ou des mécanismes spécifiques et impliquées dans l'initiation ou la progression du neuroblastome. Le problème est le suivant : les cellules tumorales sont souvent capables d'échapper à des thérapies ciblées par les mécanismes indépendants, entraînant finalement une résistance aux médicaments. Pour dévier cette problématique, les thérapies multimodales ciblant plusieurs voies cancéreuses en même temps avec une combinaison de médicaments spécifiques est priorisée. Ainsi, souvent le traitement de neuroblastome avec un mauvais pronostic (neuroblastome à haut risque ou récidivant) est constitué de trois phases décrites en introduction.

Pour le criblage de la librairie de composés épigénétiques, seulement quelques des 181 composés épigénétiques ont été dissous dans l'eau, tandis que le reste ont été dissous dans du DMSO 100%. En effet, le DMSO est un des solvants les plus utilisés pour solubiliser des molécules polaires et non polaires à cause de sa faible toxicité pour les cellules [302]. Lors de la culture cellulaire, le DMSO est souvent utilisé à des concentrations assez faibles (0,1-0,5%, v/v) et n'a pas d'effets cytotoxiques observables en dessous de 10% (v/v) [302, 303]. Cependant, à des concentrations supérieures, le DMSO a tendance à modifier la morphologie cellulaire, induire la différenciation cellulaire, provoquer la toxicité par la perméabilisation de la membrane plasmique et la formation de pores, ce qui induit l'apoptose et la réduction de la viabilité cellulaire de manière dose-dépendante [302, 303].

Lors du traitement de cellules en 2D et des sphéroïdes avec les composés épigénétiques, pour atteindre la concentration finale de 10 μ M, seulement 2 μ L de composés dilués (1/100 dans du PBS, par rapport à la solution stock) dans du DMSO a été ajouté au puits contenant 200 μ L de milieu. Ainsi, la concentration de DMSO utilisée était très faible et ne devrait pas avoir d'effets secondaires sur les cellules. Ceci a été vérifié et confirmé grâce aux puits contrôles contenant les cellules dans leur milieu et l'ajout de la même quantité du DMSO que dans les puits traités. Il a été trouvé que le DMSO n'influence pas la morphologie, la densité et la viabilité cellulaire.

Le facteur de croissance nerveuse (NGF, *nerve growth factor*) est un membre de la famille des neurotrophines impliqué dans la prolifération, la maintenance et la survie des neurones, mais aussi de plusieurs types de cellules non neuronales [304]. Il induit la régénération des neurites, améliore la plasticité synaptique et favorise la différenciation des cellules en interagissant avec les récepteurs spécifiques [304]. Par contre, les cellules de neuroblastome sont hétérogènes à différents niveaux : dans l'expression du NGF et de ses récepteurs, ainsi que dans les mécanismes de transduction [305]. Des réponses distinctes au NGF ont été obtenues pour différentes lignées de neuroblastome et ce, même pour les lignées apparentées, comme SK-N-SH et SH-SY5Y [305].

L'ajout de facteur NGF au milieu n'était pas effectué lors de la culture cellulaire, car il donne des réponses variables selon les lignées, mais principalement à cause qu'il est considéré comme un agent thérapeutique potentiel. En effet, le NGF pousserait les cellules vers l'état différencié et introduirait probablement une plus grande variété au niveau de taux de viabilité d'un puits à l'autre, alors qu'un des objectifs était de tester l'efficacité des composés épigénétiques pour le traitement de neuroblastome sans combinaison avec un autre type de thérapie et sans les variations dans les puits pour avoir des résultats de viabilité fiables.

Le facteur NGF se lie sélectivement avec une haute affinité à son récepteur membranaire tyrosine kinase (TRKA) et non sélectivement au récepteur de neurotrophine de 75 kDa, nommé p75NTR [306]. La présence du NGF provoque la dimérisation, puis l'autophosphorylation des récepteurs TRKA au niveau de certains résidus tyrosine [307]. Ainsi, la protéine transmembranaire TRKA est activée, ce qui mène à l'enclenchement de plusieurs voies de signalisation intracellulaire en aval, incluant les voies de MAPK et de PI3K [307]. Ces deux voies ont des effets au niveau de neuroprotection, de survie, de prolifération et de différenciation cellulaires, alors que la liaison de NGF à p75NTR peut provoquer l'apoptose des neurones [306].

En ce qui concerne l'expression des récepteurs TRKA chez les patients, ils sont fortement et fréquemment exprimés dans le neuroblastome de pronostic favorable (chez les nourrissons de moins d'un an et le cancer stade précoce), tandis que son expression est plutôt régulée à la baisse dans les tumeurs avancées avec l'amplification de MYCN [308, 309]. Finalement, la présence des récepteurs TRKA dans l'environnement tumoral favorise la régression spontanée du cancer [184].

Lors du développement de culture cellulaire en 3D, les mêmes conditions de température et de niveau de CO₂ qu'en 2D étaient utilisées. Les cellules cancéreuses du sphéroïde en culture ne sont pas exposées de manière homogène aux nutriments et à l'oxygène. Les différents paramètres impliqués dans la culture des sphéroïdes (ex : le niveau d'oxygène, de lactate, la température, le pH, la présence de cellules apoptotiques et nécrotiques) influencent de manière importante les paramètres évalués (la viabilité, le temps de doublement, l'expression des protéines, la réponse au médicament, etc). Ces paramètres n'étaient pas mesurés et leur influence n'était pas étudiée lors de mon projet, mais il serait intéressant d'analyser leur effet.

Dans une étude, il a été observé le nombre de cellules viables au sein des sphéroïdes est inversement proportionnel à la saturation d'oxygène (20% vs 5%) et à la concentration en glucose (16.5, 5.5, 1.7 et 0.8 mM) présents dans le milieu [310]. Ceci suggère que l'apparition de nécrose dans la partie centrale du sphéroïde est la résultante d'une compétition entre les facteurs de croissance externes et les facteurs inhibiteurs produits à l'intérieur du sphéroïde par le processus de nécrose [310]. Une diminution des taux de viabilité a aussi été observée dans la culture en 3D à long terme du neuroblastome qui s'explique probablement par l'accumulation des cellules apoptotiques et nécrotiques au fur et à mesure de la culture cellulaire.

Un des déchets connus pour s'accumuler dans les cultures cellulaires est le lactate. Celui-ci est un métabolite important pour la croissance et le métabolisme cellulaire, la signalisation des molécules et la production de glucose [311]. Ainsi, le niveau de lactate devrait être surveillé pour les cellules en culture. Il est typiquement produit pendant la phase de croissance exponentielle et sa consommation nette est plutôt observée lors de l'entrée des cellules en phase stationnaire [311]. Les mécanismes modulant la production et la consommation de lactate en culture cellulaire sont encore à l'étude. Le lactate est le produit de la glycolyse anaérobie, souvent augmentée dans le cancer à cause de l'hypoxie tissulaire [312]. Les patients avec la concentration élevée de lactate dans le sang (l'hyperlactatémie) ont souvent un pH sanguin réduit (l'acidose), ce qui donne lieu à la condition appelée acidose lactique [312]. À son tour, le pH sanguin influence plusieurs enzymes fonctionnant dans le pH neutre ou alcalin et agissant en tant que les catalyseurs dans différents processus métaboliques. Le lactate modifie aussi l'expression des gènes et l'épigénome par différents mécanismes [313].

Le milieu de culture contient du rouge de phénol, un indicateur de pH facilement visible. Il devient jaune à pH un trop acide (pH 6,8) et garde la couleur rouge orangé lors des conditions de pH neutres pour la croissance cellulaire (pH 7,0-7,7). Le pH de la culture cellulaire peut se trouver en dehors des plages optimales pour plusieurs raisons, comme 1) accumulation des métabolites acides par la culture trop dense ; 2) cellules laissées en culture trop longtemps dans le milieu sans passage de cellules ou changements de milieu ; 3) faible taux d'oxygène favorisant la production d'acide lactique par les cellules, ce qui réduira le pH de la culture et rendra le milieu jaunâtre.

Le microenvironnement tumoral est important pour la croissance incontrôlée du cancer et comprend plusieurs types de cellules, incluant les cellules immunitaires (cellules T CD4+ ou CD8+, cellules NK, macrophages, cellules dendritiques), endothéliales et les fibroblastes [314]. Il contribue au maintien du caractère souche du cancer et favorise l'angiogenèse, l'invasion, les métastases et l'inflammation chronique [314]. Par exemple, les fibroblastes associés au cancer (CAF, *cancer-associated fibroblasts*) modulent le développement vasculaire et la prolifération tumorale par les cellules immunitaires : ils inhibent leur recrutement au microenvironnement de tumeur, mais aussi leur fonction [314]. De plus, les interactions des cellules cancéreuses avec le microenvironnement tumoral sont primordiales dans la transition épithélio-mésenchymateuse et la résistance aux médicaments anticancéreux conduisant à la rechute tumorale [315]. L'expansion des cellules cancéreuses et du stroma mène à l'hypoxie par les facteurs de transcription induits par l'hypoxie (HIF-1 α) entraînant également une résistance au traitement [315]. Par conséquent, pour se rapprocher encore plus de l'environnement tumoral retrouvé chez le patient, il faudrait améliorer le modèle de culture en 3D en le rendant plus complexe. Ainsi, la co-culture devrait être développée par l'ajout aux cellules en 3D des cellules immunitaires (ex : NK) et/ou des fibroblastes.

D'après le Western Blot, les régulateurs épigénétiques impliqués dans la progression du neuroblastome *in vivo* ou *in vitro* ont une expression relative par rapport à 2D augmentée, mais cette augmentation au niveau de protéines ne corrèle pas avec l'expression attendue des marques d'histones associées à ces protéines puisqu'elles sont invariables. Notre hypothèse est que c'est plutôt une expression globale des marques d'histones qui est observée et pas locale.

Ainsi, en étudiant des régions plus précises associées par exemple à l'EZH2, probablement des variations seraient observées. Le traitement par un médicament peut ne pas avoir d'effet sur les marques des histones cibles du médicament. Par exemple, à cause de temps d'exposition pas assez long ou une dose trop faible ; des off-target qui ne ciblent pas les histones, mais d'autres mécanismes ou l'effet peut être localisé (au niveau du promoteur de gène) et pas global. Ainsi, il faudrait faire une analyse par ChiP-Seq pour étudier plus en détails tous les mécanismes.

La population des cellules apoptotiques peut être séparée de la population des cellules vivantes en cytométrie en flux grâce au marquage des cellules avec le 7-AAD ou l'annexine V. Par contre, il n'est pas possible d'exclure les cellules apoptotiques d'un culot de cellules total utilisé pour l'analyse du niveau d'expression des protéines. Malgré ceci, il faut noter que la différence du pourcentage des cellules mortes ou apoptotiques n'est pas très grande (~5-10%) entre les cellules en 2D et en 3D à n'importe quel moment durant les 24 jours de culture. Aussi, l'expression des protéines analysées par Western Blot durant mon projet (ex : HDAC, MYCN...) n'est pas affectée par les cellules apoptotiques ou nécrotiques. Par contre, d'autres types de protéines pourraient bien être influencées : certaines protéines transmembranaires ou les protéines impliquées dans l'apoptose (la famille des caspases ou des protéines Bcl-2, le peptide β -amyloïde, la protéine p53).

Notre approche de traitement avec des composés épigénétiques repose sur le fait que les modifications de l'épigénome (la méthylation de l'ADN ou les modifications d'histones) sont réversibles et les inhibiteurs des enzymes épigénétiques (ex : HDAC) constituent donc, des cibles thérapeutiques de grand intérêt. En effet, dans le criblage de 181 composés, cinq ont été retenus pour les deux lignées cellulaires SK-N-AS et IMR-32 à cause d'une spécificité en 3D (taux de viabilité faible en 3D et élevé en 2D). Parmi les composés intéressants, se trouvent deux composés ciblant les enzymes épigénétiques impliquées dans la modification des histones : l'E11 est un inhibiteur d'EZH2, une histone méthyltransférase importante et l'acide valproïque est l'inhibiteur de HDAC. Les trois autres composés ont comme cible la topoisomérase ou JAK/STAT. Il est intéressant de noter que tel que décrit dans l'introduction, l'expression élevée de certaines HDAC et d'EZH2 corrèle avec l'expression de MYCN et un mauvais pronostic, alors que leur inhibition réduit la croissance cellulaire. De plus, l'acide valproïque a déjà été trouvé en tant que composé

potentiellement intéressant pour le traitement de neuroblastome et il a été montré qu'il diminue la prolifération cellulaire et induit l'apoptose et la différenciation dans les cellules.

Il serait intéressant de continuer l'étude et de trouver le mécanisme précis par lequel agit chacun des composés sélectionnés, mais aussi de vérifier que le composé inhibe bien sa cible (ex : diminution de l'expression d'EZH2 suite au traitement des lignées cellulaires avec l'E11). De plus, il faudrait tester ces composés chez les modèles murins pour vérifier leur efficacité *in vivo* et voir s'ils n'induisent pas de toxicité grave.

Les composés épigénétiques d'intérêt représentent 14% et 6% des composés testés pour les lignées SK-N-AS et IMR-32 respectivement, mais les composés étudiés plus en détail après le criblage de masse avec les courbes dose-réponse et communs aux deux modèles représentent seulement 2,2%. Normalement avec un $p=0.05$ on s'attendrait à ~5% des composés présentant un traitement significativement fonctionnel pour le neuroblastome. Ceci suggère donc que les composés épigénétiques ne semblent pas être un type de traitement tout-à-fait adapté pour le neuroblastome pédiatrique, malgré l'efficacité prononcée de certains composés. Ainsi, d'autres catégories de composés qu'épigénétiques devraient être testés dans les cultures en 2D et en 3D.

Les cellules en 2D et en 3D au jour 24 des lignées cellulaires de neuroblastome IMR-32 et SK-N-AS ont été envoyées pour le séquençage, mais à cause des difficultés techniques survenues, les résultats ne figurent pas dans ce mémoire. Il serait très intéressant de trouver les gènes différentiellement exprimés dans chaque lignée et aussi, voir si l'expression diffère d'après la méthode de culture à l'intérieur de la même lignée (2D IMR-32 vs 3D IMR-32 ; 2D SK-N-AS vs 3D SK-N-AS) et de comparer les deux lignées entre elles pour analyser des ressemblances et des différences d'expression (2D SK-N-AS vs 2D IMR-32 ; 3D SK-N-AS vs 3D IMR-32).

Tel que discuté dans l'introduction, la surexpression de l'oncogène *MYCN* grâce au promoteur de tyrosine hydroxylase provoque l'initiation de tumeurs chez la souris transgénique et présente un modèle préclinique du neuroblastome pédiatrique imitant le microenvironnement et le phénotype tumoral. En effet, les souris possèdent une homologie génétique à ~ 80% avec l'humain, un environnement complexe tumeur-stroma et les interactions entre différentes cellules immunitaires [316].

Il serait intéressant de faire une culture de sphéroïdes à partir d'une tumeur de souris TH-MYCN avec notre méthode de culture cellulaire en 3D. Théoriquement, on s'attendrait à voir une amplification de MYCN et donc un niveau d'expression de protéine MYCN similaire à celle des lignées cellulaires MYCN amplifiées (comme dans la lignée IMR-32 utilisée dans ce mémoire). En ce qui concerne l'expression d'autres protéines que MYCN, il est difficile de prévoir un résultat attendu, car tel que décrit, le neuroblastome est une tumeur très hétérogène au niveau cellulaire et il existe des grandes différences entre les patients et parmi les lignées de neuroblastome MYCN amplifiées.

Conclusion

En conclusion, la culture en 3D semble être effectivement plus représentative du contexte de la tumeur, mais est plus complexe et possède des coûts plus élevés.

Un modèle de culture cellulaire en 3D efficace a été développé et caractérisé pour trois lignées cellulaires de neuroblastome. L'expression de plusieurs régulateurs épigénétiques impliqués dans ce cancer pédiatrique est régulée à la hausse, mais les marques d'histones (la méthylation et l'acétylation) ne sont pas influencées au niveau global.

Par la suite, des composés couramment employés dans la chimiothérapie ont été testés sur des modèles 3D et une différence de sensibilité a été obtenue entre la culture en 2D et en 3D des deux lignées cellulaires se manifestant par les valeurs d'IC50.

Finalement, un criblage de 181 composés épigénétiques a été réalisé et seulement cinq composés ont été sélectionnés à cause de l'efficacité commune aux deux lignées et une sélection pour le 3D (taux de viabilité faible pour le sphéroïde et élevé pour la culture en 2D).

Références bibliographiques

1. Kalaskar, R.R. and A.R. Kalaskar, *Neuroblastoma in early childhood: A rare case report and review of literature*. Contemp Clin Dent, 2016. **7**(3): p. 401-4.
2. Rothenberg, A.B., et al., *Neuroblastoma-remembering the three physicians who described it a century ago: James Homer Wright, William Pepper, and Robert Hutchison*. Pediatr Radiol, 2009. **39**(2): p. 155-60.
3. Kam, M., et al., [*Pepper's syndrome: report of two cases at the Charles de Gaulle University Pediatric Hospital Center, Ouagadougou (Burkina Faso)*]. Pan Afr Med J, 2017. **28**: p. 189.
4. Wright, J.H., *Neurocytoma or Neuroblastoma, a Kind of Tumor Not Generally Recognized*. J Exp Med, 1910. **12**(4): p. 556-61.
5. Tsubota, S. and K. Kadomatsu, *Origin and initiation mechanisms of neuroblastoma*. Cell Tissue Res, 2018. **372**(2): p. 211-221.
6. Cheung, N.K. and M.A. Dyer, *Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(6): p. 397-411.
7. Simoes-Costa, M. and M.E. Bronner, *Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe*. Development, 2015. **142**(2): p. 242-57.
8. Groves, A.K. and C. LaBonne, *Setting appropriate boundaries: fate, patterning and competence at the neural plate border*. Dev Biol, 2014. **389**(1): p. 2-12.
9. Stuhlmeier, T.J. and M.I. Garcia-Castro, *FGF/MAPK signaling is required in the gastrula epiblast for avian neural crest induction*. Development, 2012. **139**(2): p. 289-300.
10. Garcia-Castro, M.I., C. Marcelle, and M. Bronner-Fraser, *Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer*. Science, 2002. **297**(5582): p. 848-51.
11. Leung, A.W., et al., *WNT/beta-catenin signaling mediates human neural crest induction via a pre-neural border intermediate*. Development, 2016. **143**(3): p. 398-410.
12. Cheung, M. and J. Briscoe, *Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9*. Development, 2003. **130**(23): p. 5681-93.
13. Cheung, M., et al., *The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination*. Dev Cell, 2005. **8**(2): p. 179-92.
14. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
15. Theveneau, E. and R. Mayor, *Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration*. Dev Biol, 2012. **366**(1): p. 34-54.
16. Martik, M.L. and M.E. Bronner, *Regulatory Logic Underlying Diversification of the Neural Crest*. Trends Genet, 2017. **33**(10): p. 715-727.
17. Bronner, M.E. and M. Simoes-Costa, *The Neural Crest Migrating into the Twenty-First Century*. Curr Top Dev Biol, 2016. **116**: p. 115-34.
18. Couly, G., et al., *Determination of the identity of the derivatives of the cephalic neural crest: incompatibility between Hox gene expression and lower jaw development*. Development, 1998. **125**(17): p. 3445-59.
19. Espinosa-Medina, I., et al., *The sacral autonomic outflow is sympathetic*. Science, 2016. **354**(6314): p. 893-897.
20. Le Lievre, C.S. and N.M. Le Douarin, *Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos*. J Embryol Exp Morphol, 1975. **34**(1): p. 125-54.

21. Le Lievre, C.S., et al., *Restrictions of developmental capabilities in neural crest cell derivatives as tested by in vivo transplantation experiments*. Dev Biol, 1980. **77**(2): p. 362-78.
22. Creazzo, T.L., et al., *Role of cardiac neural crest cells in cardiovascular development*. Annu Rev Physiol, 1998. **60**: p. 267-86.
23. Knecht, A.K. and M. Bronner-Fraser, *Induction of the neural crest: a multigene process*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 453-61.
24. Matthay, K.K., et al., *Neuroblastoma*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16078.
25. Marshall, G.M., et al., *The prenatal origins of cancer*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(4): p. 277-89.
26. Huber, K., *The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives*. Dev Biol, 2006. **298**(2): p. 335-43.
27. Zimmerman, K.A., et al., *Differential expression of myc family genes during murine development*. Nature, 1986. **319**(6056): p. 780-3.
28. Mosse, Y.P., et al., *Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene*. Nature, 2008. **455**(7215): p. 930-5.
29. Reiff, T., et al., *Neuroblastoma phox2b variants stimulate proliferation and dedifferentiation of immature sympathetic neurons*. J Neurosci, 2010. **30**(3): p. 905-15.
30. De Preter, K., et al., *Human fetal neuroblast and neuroblastoma transcriptome analysis confirms neuroblast origin and highlights neuroblastoma candidate genes*. Genome Biol, 2006. **7**(9): p. R84.
31. Colon, N.C. and D.H. Chung, *Neuroblastoma*. Adv Pediatr, 2011. **58**(1): p. 297-311.
32. Capasso, M., et al., *Genetic Predisposition to Solid Pediatric Cancers*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 590033.
33. Park, J.R., A. Eggert, and H. Caron, *Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment*. Pediatr Clin North Am, 2008. **55**(1): p. 97-120, x.
34. Papaioannou, G. and K. McHugh, *Neuroblastoma in childhood: review and radiological findings*. Cancer Imaging, 2005. **5**: p. 116-27.
35. Brisse, H.J., et al., *Guidelines for imaging and staging of neuroblastic tumors: consensus report from the International Neuroblastoma Risk Group Project*. Radiology, 2011. **261**(1): p. 243-57.
36. Suzuki, M., et al., *Treatment and outcome of adult-onset neuroblastoma*. Int J Cancer, 2018. **143**(5): p. 1249-1258.
37. Esiashvili, N., et al., *Neuroblastoma in adults: Incidence and survival analysis based on SEER data*. Pediatr Blood Cancer, 2007. **49**(1): p. 41-6.
38. Rogowitz, E., et al., *Neuroblastoma of the elderly, an oncologist's nightmare: case presentation, literature review and SEER database analysis*. Exp Hematol Oncol, 2014. **3**: p. 20.
39. Wilkins, J.R., 3rd and V.D. Hundley, *Paternal occupational exposure to electromagnetic fields and neuroblastoma in offspring*. Am J Epidemiol, 1990. **131**(6): p. 995-1008.
40. Kinney, H., R. Faix, and J. Brazy, *The fetal alcohol syndrome and neuroblastoma*. Pediatrics, 1980. **66**(1): p. 130-2.
41. Kramer, S., et al., *Medical and drug risk factors associated with neuroblastoma: a case-control study*. J Natl Cancer Inst, 1987. **78**(5): p. 797-804.

42. Clausen, N., P. Andersson, and N. Tommerup, *Familial occurrence of neuroblastoma, von Recklinghausen's neurofibromatosis, Hirschsprung's agangliosis and jaw-winking syndrome*. *Acta Paediatr Scand*, 1989. **78**(5): p. 736-41.
43. Rohrer, T., et al., *Congenital central hypoventilation syndrome associated with Hirschsprung's disease and neuroblastoma: case of multiple neurocristopathies*. *Pediatr Pulmonol*, 2002. **33**(1): p. 71-6.
44. Varan, A., et al., *Neurofibromatosis type 1 and malignancy in childhood*. *Clin Genet*, 2016. **89**(3): p. 341-5.
45. Johnsen, J.I., C. Dyberg, and M. Wickstrom, *Neuroblastoma-A Neural Crest Derived Embryonal Malignancy*. *Front Mol Neurosci*, 2019. **12**: p. 9.
46. Diede, S.J., *Spontaneous regression of metastatic cancer: learning from neuroblastoma*. *Nat Rev Cancer*, 2014. **14**(2): p. 71-2.
47. Matthay, K.K., *Stage 4S neuroblastoma: what makes it special?* *J Clin Oncol*, 1998. **16**(6): p. 2003-6.
48. Nakagawara, A., *Molecular basis of spontaneous regression of neuroblastoma: role of neurotrophic signals and genetic abnormalities*. *Hum Cell*, 1998. **11**(3): p. 115-24.
49. 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*, 2000. **18**(3): p. 477-86.
50. Pritchard, J. and J.A. Hickman, *Why does stage 4s neuroblastoma regress spontaneously?* *Lancet*, 1994. **344**(8926): p. 869-70.
51. Brodeur, G.M. and R. Bagatell, *Mechanisms of neuroblastoma regression*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014. **11**(12): p. 704-13.
52. Astuti, D., et al., *RASSF1A promoter region CpG island hypermethylation in pheochromocytomas and neuroblastoma tumours*. *Oncogene*, 2001. **20**(51): p. 7573-7.
53. Takita, J., et al., *Absent or reduced expression of the caspase 8 gene occurs frequently in neuroblastoma, but not commonly in Ewing sarcoma or rhabdomyosarcoma*. *Med Pediatr Oncol*, 2000. **35**(6): p. 541-3.
54. Barbieri, E., et al., *Histone chaperone CHAF1A inhibits differentiation and promotes aggressive neuroblastoma*. *Cancer Res*, 2014. **74**(3): p. 765-74.
55. Decock, A., et al., *Neuroblastoma epigenetics: from candidate gene approaches to genome-wide screenings*. *Epigenetics*, 2011. **6**(8): p. 962-70.
56. Grau, E., et al., *Epigenetic alterations in disseminated neuroblastoma tumour cells: influence of TMS1 gene hypermethylation in relapse risk in NB patients*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010. **136**(9): p. 1415-21.
57. Yang, Q., et al., *Methylation of CASP8, DCR2, and HIN-1 in neuroblastoma is associated with poor outcome*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(11): p. 3191-7.
58. Decock, A., et al., *Stage 4S neuroblastoma tumors show a characteristic DNA methylation portrait*. *Epigenetics*, 2016. **11**(10): p. 761-771.
59. Yang, Q., et al., *Association of epigenetic inactivation of RASSF1A with poor outcome in human neuroblastoma*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(24): p. 8493-500.
60. Haruta, M., et al., *RASSF1A methylation may have two biological roles in neuroblastoma tumorigenesis depending on the ploidy status and age of patients*. *Cancer Lett*, 2014. **348**(1-2): p. 167-76.

61. Michalowski, M.B., et al., *Methylation of tumor-suppressor genes in neuroblastoma: The RASSF1A gene is almost always methylated in primary tumors*. *Pediatr Blood Cancer*, 2008. **50**(1): p. 29-32.
62. Hassan, W.M., et al., *Association of RASSF1A, DCR2, and CASP8 Methylation with Survival in Neuroblastoma: A Pooled Analysis Using Reconstructed Individual Patient Data*. *Biomed Res Int*, 2020. **2020**: p. 7390473.
63. Agathangelou, A., W.N. Cooper, and F. Latif, *Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers*. *Cancer Res*, 2005. **65**(9): p. 3497-508.
64. Harada, K., et al., *Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines*. *Oncogene*, 2002. **21**(27): p. 4345-9.
65. Dammann, R., G. Yang, and G.P. Pfeifer, *Hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers*. *Cancer Res*, 2001. **61**(7): p. 3105-9.
66. Yoon, J.H., R. Dammann, and G.P. Pfeifer, *Hypermethylation of the CpG island of the RASSF1A gene in ovarian and renal cell carcinomas*. *Int J Cancer*, 2001. **94**(2): p. 212-7.
67. Banelli, B., et al., *Distinct CpG methylation profiles characterize different clinical groups of neuroblastic tumors*. *Oncogene*, 2005. **24**(36): p. 5619-28.
68. van Noesel, M.M., et al., *Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation*. *Cancer Res*, 2002. **62**(7): p. 2157-61.
69. Stupack, D.G., et al., *Potential of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8*. *Nature*, 2006. **439**(7072): p. 95-9.
70. Maris, J.M., et al., *Neuroblastoma*. *Lancet*, 2007. **369**(9579): p. 2106-20.
71. Maris, J.M. and K.K. Matthay, *Molecular biology of neuroblastoma*. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(7): p. 2264-79.
72. Kreissman, S.G., et al., *Purged versus non-purged peripheral blood stem-cell transplantation for high-risk neuroblastoma (COG A3973): a randomised phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2013. **14**(10): p. 999-1008.
73. Park, S.H., et al., *Presence of differentiating neuroblasts in bone marrow is a favorable prognostic factor for bone marrow metastatic neuroblastoma at diagnosis*. *Ann Lab Med*, 2013. **33**(2): p. 89-96.
74. Shimada, H., et al., *Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee*. *Cancer*, 1999. **86**(2): p. 349-63.
75. Gheisari, S., et al., *Computer Aided Classification of Neuroblastoma Histological Images Using Scale Invariant Feature Transform with Feature Encoding*. *Diagnostics (Basel)*, 2018. **8**(3).
76. Pence, J.C. and N.A. Shorter, *In vitro differentiation of human neuroblastoma cells caused by vasoactive intestinal peptide*. *Cancer Res*, 1990. **50**(16): p. 5177-83.
77. Brodeur, G.M., et al., *Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage*. *Science*, 1984. **224**(4653): p. 1121-4.
78. Seeger, R.C., et al., *Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas*. *N Engl J Med*, 1985. **313**(18): p. 1111-6.

79. Ambros, I.M., et al., *Quality assessment of genetic markers used for therapy stratification*. J Clin Oncol, 2003. **21**(11): p. 2077-84.
80. Campbell, K., et al., *Association of MYCN copy number with clinical features, tumor biology, and outcomes in neuroblastoma: A report from the Children's Oncology Group*. Cancer, 2017. **123**(21): p. 4224-4235.
81. Look, A.T., et al., *Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study*. J Clin Oncol, 1991. **9**(4): p. 581-91.
82. Cohn, S.L., et al., *Analysis of DNA ploidy and proliferative activity in relation to histology and N-myc amplification in neuroblastoma*. Am J Pathol, 1990. **136**(5): p. 1043-52.
83. Bowman, L.C., et al., *Genetic staging of unresectable or metastatic neuroblastoma in infants: a Pediatric Oncology Group study*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(5): p. 373-80.
84. Pearson, A.D., et al., *High-dose rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma: a randomised trial*. Lancet Oncol, 2008. **9**(3): p. 247-56.
85. Ladenstein, R., et al., *Busulfan and melphalan versus carboplatin, etoposide, and melphalan as high-dose chemotherapy for high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): an international, randomised, multi-arm, open-label, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2017. **18**(4): p. 500-514.
86. Valteau-Couanet, D., et al., *Long-term results of the combination of the N7 induction chemotherapy and the busulfan-melphalan high dose chemotherapy*. Pediatr Blood Cancer, 2014. **61**(6): p. 977-81.
87. 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, 2009. **27**(7): p. 1007-13.
88. Brodeur, G.M., et al., *Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment*. J Clin Oncol, 1993. **11**(8): p. 1466-77.
89. 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, 1984. **73**(2): p. 405-16.
90. Shimada, H., et al., *The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system)*. Cancer, 1999. **86**(2): p. 364-72.
91. Peuchmaur, M., et al., *Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular*. Cancer, 2003. **98**(10): p. 2274-81.
92. Gestblom, C., J.C. Hoehner, and S. Pahlman, *Proliferation and apoptosis in neuroblastoma: subdividing the mitosis-karyorrhexis index*. Eur J Cancer, 1995. **31A**(4): p. 458-63.
93. Monclair, T., et al., *The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report*. J Clin Oncol, 2009. **27**(2): p. 298-303.
94. Cohn, S.L., et al., *The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report*. J Clin Oncol, 2009. **27**(2): p. 289-97.
95. Kushner, B.H., et al., *Radically different treatment recommendations for newly diagnosed neuroblastoma: pitfalls in assessment of risk*. J Pediatr Hematol Oncol, 2004. **26**(1): p. 35-9.

96. Siegel, M.J. and A. Jaju, *MR imaging of neuroblastic masses*. Magn Reson Imaging Clin N Am, 2008. **16**(3): p. 499-513, vi.
97. Tolbert, V.P. and K.K. Matthay, *Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment*. Cell Tissue Res, 2018. **372**(2): p. 195-209.
98. Ganeshan, V.R. and N.F. Schor, *Pharmacologic management of high-risk neuroblastoma in children*. Paediatr Drugs, 2011. **13**(4): p. 245-55.
99. 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, 2000. **18**(1): p. 18-26.
100. Alvarado, C.S., et al., *Natural history and biology of stage A neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group Study*. J Pediatr Hematol Oncol, 2000. **22**(3): p. 197-205.
101. Katzenstein, H.M., et al., *Prognostic significance of age, MYCN oncogene amplification, tumor cell ploidy, and histology in 110 infants with stage D(S) neuroblastoma: the pediatric oncology group experience--a pediatric oncology group study*. J Clin Oncol, 1998. **16**(6): p. 2007-17.
102. Meany, H.J., *Non-High-Risk Neuroblastoma: Classification and Achievements in Therapy*. Children (Basel), 2019. **6**(1).
103. Strother, D.R., et al., *Outcome after surgery alone or with restricted use of chemotherapy for patients with low-risk neuroblastoma: results of Children's Oncology Group study P9641*. J Clin Oncol, 2012. **30**(15): p. 1842-8.
104. Simon, T., et al., *New definition of low-risk neuroblastoma using stage, age, and 1p and MYCN status*. J Pediatr Hematol Oncol, 2004. **26**(12): p. 791-6.
105. Simon, T., et al., *Risk estimation in localized unresectable single copy MYCN neuroblastoma by the status of chromosomes 1p and 11q*. Cancer Lett, 2006. **237**(2): p. 215-22.
106. Taggart, D.R., et al., *Prognostic value of the stage 4S metastatic pattern and tumor biology in patients with metastatic neuroblastoma diagnosed between birth and 18 months of age*. J Clin Oncol, 2011. **29**(33): p. 4358-64.
107. Baker, D.L., et al., *Outcome after reduced chemotherapy for intermediate-risk neuroblastoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(14): p. 1313-23.
108. Defferrari, R., et al., *Influence of segmental chromosome abnormalities on survival in children over the age of 12 months with unresectable localised peripheral neuroblastic tumours without MYCN amplification*. Br J Cancer, 2015. **112**(2): p. 290-5.
109. Kohler, J.A., et al., *Treatment of children over the age of one year with unresectable localised neuroblastoma without MYCN amplification: results of the SIOPEN study*. Eur J Cancer, 2013. **49**(17): p. 3671-9.
110. Marachelian, A., et al., *The significance of serial histopathology in a residual mass for outcome of intermediate risk stage 3 neuroblastoma*. Pediatr Blood Cancer, 2012. **58**(5): p. 675-81.
111. Kushner, B.H., et al., *Survival from locally invasive or widespread neuroblastoma without cytotoxic therapy*. J Clin Oncol, 1996. **14**(2): p. 373-81.
112. Matthay, K.K., et al., *Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging: a Children's Cancer Group study*. J Clin Oncol, 1998. **16**(4): p. 1256-64.

113. Meany, H.J., et al., *Significance of clinical and biologic features in Stage 3 neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group project*. *Pediatr Blood Cancer*, 2014. **61**(11): p. 1932-9.
114. Park, J.R., et al., *Outcome of high-risk stage 3 neuroblastoma with myeloablative therapy and 13-cis-retinoic acid: a report from the Children's Oncology Group*. *Pediatr Blood Cancer*, 2009. **52**(1): p. 44-50.
115. Kushner, B.H., et al., *Highly effective induction therapy for stage 4 neuroblastoma in children over 1 year of age*. *J Clin Oncol*, 1994. **12**(12): p. 2607-13.
116. Ladenstein, R., et al., *Multivariate analysis of risk factors in stage 4 neuroblastoma patients over the age of one year treated with megatherapy and stem-cell transplantation: a report from the European Bone Marrow Transplantation Solid Tumor Registry*. *J Clin Oncol*, 1998. **16**(3): p. 953-65.
117. 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*, 1999. **341**(16): p. 1165-73.
118. Yanik, G.A., et al., *Validation of Postinduction Curie Scores in High-Risk Neuroblastoma: A Children's Oncology Group and SIOPEN Group Report on SIOPEN/HR-NBL1*. *J Nucl Med*, 2018. **59**(3): p. 502-508.
119. Yanik, G.A., et al., *Semiquantitative mIBG scoring as a prognostic indicator in patients with stage 4 neuroblastoma: a report from the Children's oncology group*. *J Nucl Med*, 2013. **54**(4): p. 541-8.
120. Modak, S., et al., *Combination of bevacizumab, irinotecan, and temozolomide for refractory or relapsed neuroblastoma: Results of a phase II study*. *Pediatr Blood Cancer*, 2017. **64**(8).
121. Matthay, K.K., et al., *Phase II study on the effect of disease sites, age, and prior therapy on response to iodine-131-metaiodobenzylguanidine therapy in refractory neuroblastoma*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(9): p. 1054-60.
122. Bagatell, R., et al., *Phase II study of irinotecan and temozolomide in children with relapsed or refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group study*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(2): p. 208-13.
123. Simon, T., et al., *Role of surgery in the treatment of patients with stage 4 neuroblastoma age 18 months or older at diagnosis*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(6): p. 752-8.
124. von Allmen, D., et al., *Impact of Extent of Resection on Local Control and Survival in Patients From the COG A3973 Study With High-Risk Neuroblastoma*. *J Clin Oncol*, 2017. **35**(2): p. 208-216.
125. Adkins, E.S., et al., *Efficacy of complete resection for high-risk neuroblastoma: a Children's Cancer Group study*. *J Pediatr Surg*, 2004. **39**(6): p. 931-6.
126. Mullassery, D., P. Farrelly, and P.D. Losty, *Does aggressive surgical resection improve survival in advanced stage 3 and 4 neuroblastoma? A systematic review and meta-analysis*. *Pediatr Hematol Oncol*, 2014. **31**(8): p. 703-16.
127. Kushner, B.H., et al., *Hyperfractionated low-dose radiotherapy for high-risk neuroblastoma after intensive chemotherapy and surgery*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(11): p. 2821-8.

128. Haas-Kogan, D.A., et al., *Impact of radiotherapy for high-risk neuroblastoma: a Children's Cancer Group study*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003. **56**(1): p. 28-39.
129. Berthold, F., et al., *Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: a randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2005. **6**(9): p. 649-58.
130. Pritchard, J., et al., *High dose melphalan in the treatment of advanced neuroblastoma: results of a randomised trial (ENSG-1) by the European Neuroblastoma Study Group*. Pediatr Blood Cancer, 2005. **44**(4): p. 348-57.
131. Park, J.R., et al., *Pilot induction regimen incorporating pharmacokinetically guided topotecan for treatment of newly diagnosed high-risk neuroblastoma: a Children's Oncology Group study*. J Clin Oncol, 2011. **29**(33): p. 4351-7.
132. Saarinen-Pihkala, U.M., et al., *Thiotepa and melphalan based single, tandem, and triple high dose therapy and autologous stem cell transplantation for high risk neuroblastoma*. Pediatr Blood Cancer, 2012. **59**(7): p. 1190-7.
133. George, R.E., et al., *High-risk neuroblastoma treated with tandem autologous peripheral-blood stem cell-supported transplantation: long-term survival update*. J Clin Oncol, 2006. **24**(18): p. 2891-6.
134. Seif, A.E., et al., *A pilot study of tandem high-dose chemotherapy with stem cell rescue as consolidation for high-risk neuroblastoma: Children's Oncology Group study ANBLOOP1*. Bone Marrow Transplant, 2013. **48**(7): p. 947-52.
135. Park, J.R., et al., *Effect of Tandem Autologous Stem Cell Transplant vs Single Transplant on Event-Free Survival in Patients With High-Risk Neuroblastoma: A Randomized Clinical Trial*. JAMA, 2019. **322**(8): p. 746-755.
136. Yu, A.L., et al., *Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(14): p. 1324-34.
137. Dhillon, S., *Dinutuximab: first global approval*. Drugs, 2015. **75**(8): p. 923-7.
138. Mody, R., et al., *Irinotecan-temozolomide with temsirolimus or dinutuximab in children with refractory or relapsed neuroblastoma (COG ANBL1221): an open-label, randomised, phase 2 trial*. Lancet Oncol, 2017. **18**(7): p. 946-957.
139. Federico, S.M., et al., *A Pilot Trial of Humanized Anti-GD2 Monoclonal Antibody (hu14.18K322A) with Chemotherapy and Natural Killer Cells in Children with Recurrent/Refractory Neuroblastoma*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(21): p. 6441-6449.
140. Pinto, N.R., et al., *Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma*. J Clin Oncol, 2015. **33**(27): p. 3008-17.
141. Kushner, B.H., et al., *Irinotecan plus temozolomide for relapsed or refractory neuroblastoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(33): p. 5271-6.
142. Di Giannatale, A., et al., *Phase II study of temozolomide in combination with topotecan (TOTEM) in relapsed or refractory neuroblastoma: a European Innovative Therapies for Children with Cancer-SIOP-European Neuroblastoma study*. Eur J Cancer, 2014. **50**(1): p. 170-7.
143. London, W.B., et al., *Phase II randomized comparison of topotecan plus cyclophosphamide versus topotecan alone in children with recurrent or refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group study*. J Clin Oncol, 2010. **28**(24): p. 3808-15.

144. Zafar, A., et al., *Molecular targeting therapies for neuroblastoma: Progress and challenges*. Med Res Rev, 2021. **41**(2): p. 961-1021.
145. Hay, M., et al., *Clinical development success rates for investigational drugs*. Nat Biotechnol, 2014. **32**(1): p. 40-51.
146. Pugh, T.J., et al., *The genetic landscape of high-risk neuroblastoma*. Nat Genet, 2013. **45**(3): p. 279-84.
147. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers*. Nature, 2012. **489**(7417): p. 519-25.
148. Banerji, S., et al., *Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes*. Nature, 2012. **486**(7403): p. 405-9.
149. Chapman, M.A., et al., *Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma*. Nature, 2011. **471**(7339): p. 467-72.
150. Imielinski, M., et al., *Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing*. Cell, 2012. **150**(6): p. 1107-20.
151. Benard, J., et al., *MYCN-non-amplified metastatic neuroblastoma with good prognosis and spontaneous regression: a molecular portrait of stage 4S*. Mol Oncol, 2008. **2**(3): p. 261-71.
152. Brodeur, G.M., *Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(3): p. 203-16.
153. Molenaar, J.J., et al., *Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes*. Nature, 2012. **483**(7391): p. 589-93.
154. Cheung, N.K., et al., *Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma*. JAMA, 2012. **307**(10): p. 1062-71.
155. Sausen, M., et al., *Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma*. Nat Genet, 2013. **45**(1): p. 12-7.
156. Brodeur, G.M. and C.T. Fong, *Molecular biology and genetics of human neuroblastoma*. Cancer Genet Cytogenet, 1989. **41**(2): p. 153-74.
157. Schmidt, M.L., et al., *Biologic factors determine prognosis in infants with stage IV neuroblastoma: A prospective Children's Cancer Group study*. J Clin Oncol, 2000. **18**(6): p. 1260-8.
158. Knoepfler, P.S., P.F. Cheng, and R.N. Eisenman, *N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation*. Genes Dev, 2002. **16**(20): p. 2699-712.
159. Chesler, L. and W.A. Weiss, *Genetically engineered murine models--contribution to our understanding of the genetics, molecular pathology and therapeutic targeting of neuroblastoma*. Semin Cancer Biol, 2011. **21**(4): p. 245-55.
160. Teitz, T., et al., *Th-MYCN mice with caspase-8 deficiency develop advanced neuroblastoma with bone marrow metastasis*. Cancer Res, 2013. **73**(13): p. 4086-97.
161. Burkhart, C.A., et al., *Effects of MYCN antisense oligonucleotide administration on tumorigenesis in a murine model of neuroblastoma*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(18): p. 1394-403.
162. Meyer, N. and L.Z. Penn, *Reflecting on 25 years with MYC*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(12): p. 976-90.

163. Malynn, B.A., et al., *N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation*. *Genes Dev*, 2000. **14**(11): p. 1390-9.
164. Huang, M. and W.A. Weiss, *Neuroblastoma and MYCN*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. **3**(10): p. a014415.
165. Beltran, H., *The N-myc Oncogene: Maximizing its Targets, Regulation, and Therapeutic Potential*. *Mol Cancer Res*, 2014. **12**(6): p. 815-22.
166. He, S., et al., *MYCN and the epigenome*. *Front Oncol*, 2013. **3**: p. 1.
167. Baluapuri, A., E. Wolf, and M. Eilers, *Target gene-independent functions of MYC oncoproteins*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020. **21**(5): p. 255-267.
168. Wenzel, A. and M. Schwab, *The mycN/max protein complex in neuroblastoma. Short review*. *Eur J Cancer*, 1995. **31A**(4): p. 516-9.
169. Corvetta, D., et al., *Physical interaction between MYCN oncogene and polycomb repressive complex 2 (PRC2) in neuroblastoma: functional and therapeutic implications*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(12): p. 8332-8341.
170. Amente, S., et al., *Lysine-specific demethylase (LSD1/KDM1A) and MYCN cooperatively repress tumor suppressor genes in neuroblastoma*. *Oncotarget*, 2015. **6**(16): p. 14572-83.
171. Liu, X., et al., *c-Myc transformation domain recruits the human STAGA complex and requires TRRAP and GCN5 acetylase activity for transcription activation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(22): p. 20405-12.
172. Lin, C.Y., et al., *Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc*. *Cell*, 2012. **151**(1): p. 56-67.
173. Nie, Z., et al., *c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells*. *Cell*, 2012. **151**(1): p. 68-79.
174. Soufi, A., G. Donahue, and K.S. Zaret, *Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome*. *Cell*, 2012. **151**(5): p. 994-1004.
175. Guccione, E., et al., *Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(7): p. 764-70.
176. Liu, Z., et al., *Targeting MYCN in Pediatric and Adult Cancers*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 623679.
177. Valsesia-Wittmann, S., et al., *Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells*. *Cancer Cell*, 2004. **6**(6): p. 625-30.
178. Slack, A., et al., *The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(3): p. 731-6.
179. Teitz, T., et al., *Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN*. *Nat Med*, 2000. **6**(5): p. 529-35.
180. Iolascon, A., et al., *Caspase 3 and 8 deficiency in human neuroblastoma*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2003. **146**(1): p. 41-7.
181. Nakagawara, A., et al., *Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(1): p. 759-67.
182. Ho, R., et al., *Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas*. *Cancer Res*, 2002. **62**(22): p. 6462-6.
183. Dewitt, J., et al., *Constitutively active TrkB confers an aggressive transformed phenotype to a neural crest-derived cell line*. *Oncogene*, 2014. **33**(8): p. 977-85.

184. Iraci, N., et al., *A SP1/MIZ1/MYCN repression complex recruits HDAC1 at the TRKA and p75NTR promoters and affects neuroblastoma malignancy by inhibiting the cell response to NGF*. *Cancer Res*, 2011. **71**(2): p. 404-12.
185. Ochiai, H., et al., *Bmi1 is a MYCN target gene that regulates tumorigenesis through repression of KIF1Bbeta and TSLC1 in neuroblastoma*. *Oncogene*, 2010. **29**(18): p. 2681-90.
186. Huang, R., et al., *MYCN and MYC regulate tumor proliferation and tumorigenesis directly through BMI1 in human neuroblastomas*. *FASEB J*, 2011. **25**(12): p. 4138-49.
187. Zhao, X., et al., *The N-Myc-DLL3 cascade is suppressed by the ubiquitin ligase Huwe1 to inhibit proliferation and promote neurogenesis in the developing brain*. *Dev Cell*, 2009. **17**(2): p. 210-21.
188. Cotterman, R. and P.S. Knoepfler, *N-Myc regulates expression of pluripotency genes in neuroblastoma including lif, klf2, klf4, and lin28b*. *PLoS One*, 2009. **4**(6): p. e5799.
189. Zaizen, Y., et al., *The effect of N-myc amplification and expression on invasiveness of neuroblastoma cells*. *J Pediatr Surg*, 1993. **28**(6): p. 766-9.
190. Goodman, L.A., et al., *Modulation of N-myc expression alters the invasiveness of neuroblastoma*. *Clin Exp Metastasis*, 1997. **15**(2): p. 130-9.
191. Tanaka, N. and M. Fukuzawa, *MYCN downregulates integrin alpha1 to promote invasion of human neuroblastoma cells*. *Int J Oncol*, 2008. **33**(4): p. 815-21.
192. van Golen, C.M., et al., *N-Myc overexpression leads to decreased beta1 integrin expression and increased apoptosis in human neuroblastoma cells*. *Oncogene*, 2003. **22**(17): p. 2664-73.
193. Megison, M.L., et al., *FAK inhibition decreases cell invasion, migration and metastasis in MYCN amplified neuroblastoma*. *Clin Exp Metastasis*, 2013. **30**(5): p. 555-68.
194. Tweddle, D.A., et al., *p53 cellular localization and function in neuroblastoma: evidence for defective G(1) arrest despite WAF1 induction in MYCN-amplified cells*. *Am J Pathol*, 2001. **158**(6): p. 2067-77.
195. Bell, E., J. Lunec, and D.A. Tweddle, *Cell cycle regulation targets of MYCN identified by gene expression microarrays*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(10): p. 1249-56.
196. Muth, D., et al., *Transcriptional repression of SKP2 is impaired in MYCN-amplified neuroblastoma*. *Cancer Res*, 2010. **70**(9): p. 3791-802.
197. Gogolin, S., et al., *CDK4 inhibition restores G(1)-S arrest in MYCN-amplified neuroblastoma cells in the context of doxorubicin-induced DNA damage*. *Cell Cycle*, 2013. **12**(7): p. 1091-104.
198. Cole, K.A., et al., *RNAi screen of the protein kinome identifies checkpoint kinase 1 (CHK1) as a therapeutic target in neuroblastoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(8): p. 3336-41.
199. Valli, E., et al., *CDKL5, a novel MYCN-repressed gene, blocks cell cycle and promotes differentiation of neuronal cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1819**(11-12): p. 1173-85.
200. Iavarone, A., et al., *The helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein*. *Genes Dev*, 1994. **8**(11): p. 1270-84.
201. Lasorella, A., A. Iavarone, and M.A. Israel, *Id2 specifically alters regulation of the cell cycle by tumor suppressor proteins*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(6): p. 2570-8.

202. Lasorella, A., et al., *Id2 is critical for cellular proliferation and is the oncogenic effector of N-myc in human neuroblastoma*. *Cancer Res*, 2002. **62**(1): p. 301-6.
203. Song, L., et al., *Oncogene MYCN regulates localization of NKT cells to the site of disease in neuroblastoma*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(9): p. 2702-12.
204. Meitar, D., et al., *Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma*. *J Clin Oncol*, 1996. **14**(2): p. 405-14.
205. Ribatti, D., et al., *In vivo angiogenic activity of neuroblastoma correlates with MYCN oncogene overexpression*. *Int J Cancer*, 2002. **102**(4): p. 351-4.
206. Ozer, E., et al., *Association of MYCN amplification and 1p deletion in neuroblastomas with high tumor vascularity*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2007. **15**(2): p. 181-6.
207. Dungwa, J.V., et al., *Angiogenin up-regulation correlates with adverse clinicopathological and biological factors, increased microvascular density and poor patient outcome in neuroblastomas*. *Histopathology*, 2012. **60**(6): p. 911-23.
208. Kang, J., et al., *N-myc is a novel regulator of PI3K-mediated VEGF expression in neuroblastoma*. *Oncogene*, 2008. **27**(28): p. 3999-4007.
209. Chanthery, Y.H., et al., *Paracrine signaling through MYCN enhances tumor-vascular interactions in neuroblastoma*. *Sci Transl Med*, 2012. **4**(115): p. 115ra3.
210. Muller, I., et al., *Targeting of the MYCN protein with small molecule c-MYC inhibitors*. *PLoS One*, 2014. **9**(5): p. e97285.
211. Zirath, H., et al., *MYC inhibition induces metabolic changes leading to accumulation of lipid droplets in tumor cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(25): p. 10258-63.
212. Yang, Y., et al., *Silencing of AURKA augments the antitumor efficacy of the AURKA inhibitor MLN8237 on neuroblastoma cells*. *Cancer Cell Int*, 2020. **20**: p. 9.
213. Chesler, L., et al., *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase destabilizes Mycn protein and blocks malignant progression in neuroblastoma*. *Cancer Res*, 2006. **66**(16): p. 8139-46.
214. Puissant, A., et al., *Targeting MYCN in neuroblastoma by BET bromodomain inhibition*. *Cancer Discov*, 2013. **3**(3): p. 308-23.
215. Wyce, A., et al., *BET inhibition silences expression of MYCN and BCL2 and induces cytotoxicity in neuroblastoma tumor models*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e72967.
216. Janoueix-Lerosey, I., et al., *Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma*. *Nature*, 2008. **455**(7215): p. 967-70.
217. Greengard, E.G., *Molecularly Targeted Therapy for Neuroblastoma*. *Children (Basel)*, 2018. **5**(10).
218. Ritenour, L.E., et al., *Genetic susceptibility to neuroblastoma: current knowledge and future directions*. *Cell Tissue Res*, 2018. **372**(2): p. 287-307.
219. Guan, J., et al., *FAM150A and FAM150B are activating ligands for anaplastic lymphoma kinase*. *Elife*, 2015. **4**: p. e09811.
220. Berry, T., et al., *The ALK(F1174L) mutation potentiates the oncogenic activity of MYCN in neuroblastoma*. *Cancer Cell*, 2012. **22**(1): p. 117-30.
221. Schonherr, C., et al., *Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) regulates initiation of transcription of MYCN in neuroblastoma cells*. *Oncogene*, 2012. **31**(50): p. 5193-200.
222. De Brouwer, S., et al., *Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(17): p. 4353-62.

223. Mosse, Y.P., *Anaplastic Lymphoma Kinase as a Cancer Target in Pediatric Malignancies*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(3): p. 546-52.
224. Hallberg, B. and R.H. Palmer, *Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(10): p. 685-700.
225. Eleveld, T.F., et al., *Relapsed neuroblastomas show frequent RAS-MAPK pathway mutations*. Nat Genet, 2015. **47**(8): p. 864-71.
226. Devoto, M., et al., *Genome-wide linkage analysis to identify genetic modifiers of ALK mutation penetrance in familial neuroblastoma*. Hum Hered, 2011. **71**(2): p. 135-9.
227. Bresler, S.C., et al., *ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma*. Cancer Cell, 2014. **26**(5): p. 682-94.
228. Ueda, T., et al., *ALK(R1275Q) perturbs extracellular matrix, enhances cell invasion and leads to the development of neuroblastoma in cooperation with MYCN*. Oncogene, 2016. **35**(34): p. 4447-58.
229. Padovan-Merhar, O.M., et al., *Enrichment of Targetable Mutations in the Relapsed Neuroblastoma Genome*. PLoS Genet, 2016. **12**(12): p. e1006501.
230. Mosse, Y.P., et al., *Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study*. Lancet Oncol, 2013. **14**(6): p. 472-80.
231. Lu, J., et al., *The second-generation ALK inhibitor alectinib effectively induces apoptosis in human neuroblastoma cells and inhibits tumor growth in a TH-MYCN transgenic neuroblastoma mouse model*. Cancer Lett, 2017. **400**: p. 61-68.
232. Wang, Y., et al., *Novel ALK inhibitor AZD3463 inhibits neuroblastoma growth by overcoming crizotinib resistance and inducing apoptosis*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 19423.
233. Infarinato, N.R., et al., *The ALK/ROS1 Inhibitor PF-06463922 Overcomes Primary Resistance to Crizotinib in ALK-Driven Neuroblastoma*. Cancer Discov, 2016. **6**(1): p. 96-107.
234. Hida, T., et al., *Alectinib versus crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer (J-ALEX): an open-label, randomised phase 3 trial*. Lancet, 2017. **390**(10089): p. 29-39.
235. Mosse, Y.P., et al., *Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma*. Am J Hum Genet, 2004. **75**(4): p. 727-30.
236. Trochet, D., et al., *Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma*. Am J Hum Genet, 2004. **74**(4): p. 761-4.
237. Raabe, E.H., et al., *Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in neuroblastoma*. Oncogene, 2008. **27**(4): p. 469-76.
238. Bosse, K.R. and J.M. Maris, *Advances in the translational genomics of neuroblastoma: From improving risk stratification and revealing novel biology to identifying actionable genomic alterations*. Cancer, 2016. **122**(1): p. 20-33.
239. Bachetti, T., et al., *PHOX2B-mediated regulation of ALK expression: in vitro identification of a functional relationship between two genes involved in neuroblastoma*. PLoS One, 2010. **5**(10).
240. Ke, X.X., et al., *Phox2B correlates with MYCN and is a prognostic marker for neuroblastoma development*. Oncol Lett, 2015. **9**(6): p. 2507-2514.

241. Eleveld, T.F., et al., *RAS-MAPK Pathway-Driven Tumor Progression Is Associated with Loss of CIC and Other Genomic Aberrations in Neuroblastoma*. *Cancer Res*, 2018. **78**(21): p. 6297-6307.
242. Di Zanni, E., et al., *Targeting of PHOX2B expression allows the identification of drugs effective in counteracting neuroblastoma cell growth*. *Oncotarget*, 2017. **8**(42): p. 72133-72146.
243. Di Zanni, E., et al., *Identification of novel pathways and molecules able to down-regulate PHOX2B gene expression by in vitro drug screening approaches in neuroblastoma cells*. *Exp Cell Res*, 2015. **336**(1): p. 43-57.
244. Suebsoonthron, J., et al., *Inhibition of WNT signaling reduces differentiation and induces sensitivity to doxorubicin in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells*. *Anticancer Drugs*, 2017. **28**(5): p. 469-479.
245. Mutesa, L., et al., *Germline PTPN11 missense mutation in a case of Noonan syndrome associated with mediastinal and retroperitoneal neuroblastic tumors*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2008. **182**(1): p. 40-2.
246. Shain, A.H. and J.R. Pollack, *The spectrum of SWI/SNF mutations, ubiquitous in human cancers*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e55119.
247. Meddeb, M., et al., *Additional copies of a 25 Mb chromosomal region originating from 17q23.1-17qter are present in 90% of high-grade neuroblastomas*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1996. **17**(3): p. 156-65.
248. Lastowska, M., et al., *Gain of chromosome arm 17q predicts unfavourable outcome in neuroblastoma patients. U.K. Children's Cancer Study Group and the U.K. Cancer Cytogenetics Group*. *Eur J Cancer*, 1997. **33**(10): p. 1627-33.
249. Abel, F., et al., *Gain of chromosome arm 17q is associated with unfavourable prognosis in neuroblastoma, but does not involve mutations in the somatostatin receptor 2(SSTR2) gene at 17q24*. *Br J Cancer*, 1999. **81**(8): p. 1402-9.
250. Le Guezennec, X. and D.V. Bulavin, *WIP1 phosphatase at the crossroads of cancer and aging*. *Trends Biochem Sci*, 2010. **35**(2): p. 109-14.
251. Saito-Ohara, F., et al., *PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma*. *Cancer Res*, 2003. **63**(8): p. 1876-83.
252. Guo, C., et al., *Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas*. *Oncogene*, 1999. **18**(35): p. 4948-57.
253. Nowacki, S., et al., *Expression of the tumour suppressor gene CADM1 is associated with favourable outcome and inhibits cell survival in neuroblastoma*. *Oncogene*, 2008. **27**(23): p. 3329-38.
254. Attiyeh, E.F., et al., *Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(21): p. 2243-53.
255. Caron, H., et al., *Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(4): p. 225-30.
256. Bagchi, A., et al., *CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36*. *Cell*, 2007. **128**(3): p. 459-75.
257. Koyama, H., et al., *Mechanisms of CHD5 Inactivation in neuroblastomas*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(6): p. 1588-97.
258. Esteller, M., *Epigenetics in cancer*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(11): p. 1148-59.

259. Hamilton, J.P., *Epigenetics: principles and practice*. Dig Dis, 2011. **29**(2): p. 130-5.
260. Gibney, E.R. and C.M. Nolan, *Epigenetics and gene expression*. Heredity (Edinb), 2010. **105**(1): p. 4-13.
261. Biswas, S. and C.M. Rao, *Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy*. Eur J Pharmacol, 2018. **837**: p. 8-24.
262. Hogg, S.J., et al., *Targeting the epigenetic regulation of antitumour immunity*. Nat Rev Drug Discov, 2020. **19**(11): p. 776-800.
263. Nafee, T.M., et al., *Epigenetic control of fetal gene expression*. BJOG, 2008. **115**(2): p. 158-68.
264. Illingworth, R., et al., *A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci*. PLoS Biol, 2008. **6**(1): p. e22.
265. Prokhortchouk, E. and P.A. Defossez, *The cell biology of DNA methylation in mammals*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(11): p. 2167-73.
266. Tonini, G.P. and M. Capasso, *Genetic predisposition and chromosome instability in neuroblastoma*. Cancer Metastasis Rev, 2020. **39**(1): p. 275-285.
267. Calvisi, D.F., et al., *Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma*. J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2713-22.
268. Herman, J.G. and S.B. Baylin, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. N Engl J Med, 2003. **349**(21): p. 2042-54.
269. Newell-Price, J., A.J. Clark, and P. King, *DNA methylation and silencing of gene expression*. Trends Endocrinol Metab, 2000. **11**(4): p. 142-8.
270. Surani, M.A., *Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 122-8.
271. Goll, M.G., et al., *Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2*. Science, 2006. **311**(5759): p. 395-8.
272. Klose, R.J. and A.P. Bird, *Genomic DNA methylation: the mark and its mediators*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(2): p. 89-97.
273. Ito, S., et al., *Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine*. Science, 2011. **333**(6047): p. 1300-3.
274. Qiu, Y.Y., B.L. Mirkin, and R.S. Dwivedi, *Inhibition of DNA methyltransferase reverses cisplatin induced drug resistance in murine neuroblastoma cells*. Cancer Detect Prev, 2005. **29**(5): p. 456-63.
275. Bartolucci, S., et al., *5-Aza-2'-deoxycytidine as inducer of differentiation and growth inhibition in mouse neuroblastoma cells*. Cell Differ Dev, 1989. **27**(1): p. 47-55.
276. Charlet, J., et al., *DNA demethylation increases sensitivity of neuroblastoma cells to chemotherapeutic drugs*. Biochem Pharmacol, 2012. **83**(7): p. 858-65.
277. Fetahu, I.S. and S. Taschner-Mandl, *Neuroblastoma and the epigenome*. Cancer Metastasis Rev, 2021. **40**(1): p. 173-189.
278. Asada, K., M. Abe, and T. Ushijima, *Clinical application of the CpG island methylator phenotype to prognostic diagnosis in neuroblastomas*. J Hum Genet, 2013. **58**(7): p. 428-33.
279. Roth, S.Y., J.M. Denu, and C.D. Allis, *Histone acetyltransferases*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 81-120.

280. Secci, D., et al., *Synthesis of a novel series of thiazole-based histone acetyltransferase inhibitors*. *Bioorg Med Chem*, 2014. **22**(5): p. 1680-9.
281. Gajer, J.M., et al., *Histone acetyltransferase inhibitors block neuroblastoma cell growth in vivo*. *Oncogenesis*, 2015. **4**: p. e137.
282. Kim, M.K. and W.L. Carroll, *Autoregulation of the N-myc gene is operative in neuroblastoma and involves histone deacetylase 2*. *Cancer*, 2004. **101**(9): p. 2106-15.
283. Rettig, I., et al., *Selective inhibition of HDAC8 decreases neuroblastoma growth in vitro and in vivo and enhances retinoic acid-mediated differentiation*. *Cell Death Dis*, 2015. **6**: p. e1657.
284. Stockhausen, M.T., et al., *Effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on Notch signalling in human neuroblastoma cells*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(4): p. 751-9.
285. Cortes, C., et al., *MYCN concurrence with SAHA-induced cell death in human neuroblastoma cells*. *Cell Oncol (Dordr)*, 2015. **38**(5): p. 341-52.
286. Li, Z., et al., *EZH2 regulates neuroblastoma cell differentiation via NTRK1 promoter epigenetic modifications*. *Oncogene*, 2018. **37**(20): p. 2714-2727.
287. Lu, Z., et al., *Histone-lysine methyltransferase EHMT2 is involved in proliferation, apoptosis, cell invasion, and DNA methylation of human neuroblastoma cells*. *Anticancer Drugs*, 2013. **24**(5): p. 484-93.
288. Walport, L.J., R.J. Hopkinson, and C.J. Schofield, *Mechanisms of human histone and nucleic acid demethylases*. *Curr Opin Chem Biol*, 2012. **16**(5-6): p. 525-34.
289. Lodrini, M., et al., *Using droplet digital PCR to analyze MYCN and ALK copy number in plasma from patients with neuroblastoma*. *Oncotarget*, 2017. **8**(49): p. 85234-85251.
290. Blanc, E., et al., *MYCN enhances P-gp/MDR1 gene expression in the human metastatic neuroblastoma IGR-N-91 model*. *Am J Pathol*, 2003. **163**(1): p. 321-31.
291. Wang, C., et al., *EZH2 Mediates epigenetic silencing of neuroblastoma suppressor genes CASZ1, CLU, RUNX3, and NGFR*. *Cancer Res*, 2012. **72**(1): p. 315-24.
292. Bellamy, J., et al., *Increased Efficacy of Histone Methyltransferase G9a Inhibitors Against MYCN-Amplified Neuroblastoma*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 818.
293. Jubierre, L., et al., *BRG1/SMARCA4 is essential for neuroblastoma cell viability through modulation of cell death and survival pathways*. *Oncogene*, 2016. **35**(39): p. 5179-90.
294. Wang, M., et al., *Copy number gain of MYCN gene is a recurrent genetic aberration and favorable prognostic factor in Chinese pediatric neuroblastoma patients*. *Diagn Pathol*, 2013. **8**: p. 5.
295. Go, R.S. and A.A. Adjei, *Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin*. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(1): p. 409-22.
296. Antoni, D., et al., *Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo*. *Int J Mol Sci*, 2015. **16**(3): p. 5517-27.
297. Ravi, M., et al., *3D cell culture systems: advantages and applications*. *J Cell Physiol*, 2015. **230**(1): p. 16-26.
298. Costa, E.C., et al., *3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis*. *Biotechnol Adv*, 2016. **34**(8): p. 1427-1441.
299. Langhans, S.A., *Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning*. *Front Pharmacol*, 2018. **9**: p. 6.

300. Pontes Soares, C., et al., *2D and 3D-organized cardiac cells shows differences in cellular morphology, adhesion junctions, presence of myofibrils and protein expression*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e38147.
301. Imamura, Y., et al., *Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer*. Oncol Rep, 2015. **33**(4): p. 1837-43.
302. Galvao, J., et al., *Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO*. FASEB J, 2014. **28**(3): p. 1317-30.
303. Chen, X. and S. Thibeault, *Effect of DMSO concentration, cell density and needle gauge on the viability of cryopreserved cells in three dimensional hyaluronan hydrogel*. Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc, 2013. **2013**: p. 6228-31.
304. Sonnenfeld, K.H. and D.N. Ishii, *Nerve growth factor effects and receptors in cultured human neuroblastoma cell lines*. J Neurosci Res, 1982. **8**(2-3): p. 375-91.
305. Janet, T., et al., *Heterogeneity of human neuroblastoma cell lines in their proliferative responses to basic FGF, NGF, and EGF: correlation with expression of growth factors and growth factor receptors*. J Neurosci Res, 1995. **40**(6): p. 707-15.
306. Travaglia, A., et al., *A small linear peptide encompassing the NGF N-terminus partly mimics the biological activities of the entire neurotrophin in PC12 cells*. ACS Chem Neurosci, 2015. **6**(8): p. 1379-92.
307. Arevalo, J.C., et al., *TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(16): p. 5908-16.
308. Nakagawara, A., et al., *Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas*. Cancer Res, 1992. **52**(5): p. 1364-8.
309. Nakagawara, A., et al., *Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma*. N Engl J Med, 1993. **328**(12): p. 847-54.
310. Freyer, J.P. and R.M. Sutherland, *Regulation of growth saturation and development of necrosis in EMT6/Ro multicellular spheroids by the glucose and oxygen supply*. Cancer Res, 1986. **46**(7): p. 3504-12.
311. Zagari, F., et al., *Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity*. N Biotechnol, 2013. **30**(2): p. 238-45.
312. Wang, Y., et al., *Pyruvate is a prospective alkalizer to correct hypoxic lactic acidosis*. Mil Med Res, 2018. **5**(1): p. 13.
313. Izzo, L.T. and K.E. Wellen, *Histone lactylation links metabolism and gene regulation*. Nature, 2019. **574**(7779): p. 492-493.
314. Denton, A.E., E.W. Roberts, and D.T. Fearon, *Stromal Cells in the Tumor Microenvironment*. Adv Exp Med Biol, 2018. **1060**: p. 99-114.
315. Erin, N., et al., *Tumor microenvironment and epithelial mesenchymal transition as targets to overcome tumor multidrug resistance*. Drug Resist Updat, 2020. **53**: p. 100715.
316. Mouse Genome Sequencing, C., et al., *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome*. Nature, 2002. **420**(6915): p. 520-62.
317. Grexa, I., et al., *SpheroidPicker for automated 3D cell culture manipulation using deep learning*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 14813.

Annexe

Établissement du nouveau modèle de culture en 3D avec la lignée IGR-N-91

Pour développer un nouveau modèle de culture cellulaire en 3D, les cellules en 2D ont été mises en sphéroïdes dans quatre différents milieux (DMEM, RPMI, F12K, DMEM/F12K 1 : 1). Les sphéroïdes de la lignée IGR-N-91 ont été cultivés plusieurs semaines pour évaluer régulièrement leur temps de doublement et mesurer leur viabilités (Figure S1A). Le temps de doublement n'a pas été affecté par le milieu de culture : pour les 4 milieux, il se situe à ~85 h au jour 3 de culture et à ~100 h pour les jours 10 et 17, puis il augmente jusqu'à autour de 150 h au jour 24 et ~125 h au jour 31 (Figure S1B). Donc, le milieu de culture n'influence pas le temps de doublement.

En ce qui concerne la viabilité, au jour 6, il n'y a pas de différence entre les milieux de culture et les viabilités sont à ~90% (Figure S1C). Ensuite, le RPMI semble être le milieu le moins favorable pour la culture en 3D de IGR-N-91 à cause de sa courbe de viabilité la plus basse des quatre milieux (55%, 32%, 32% et 49% aux jours 13, 20, 34 et 41, respectivement), tandis que le milieu DMEM/F12K 1 : 1 semble être celui qui convient le plus avec la meilleure courbe de viabilité des quatre milieux (85%, 76%, 58% et 63% aux jours 13, 20, 34 et 41 respectivement). Le mélange DMEM/F12K est d'ailleurs un milieu souvent utilisés dans les cultures cellulaires en 3D pour son enrichissement en glucose et différents acides aminés [317]. Les courbes de viabilité des milieux F12K et DMEM se trouvent entre celles de RPMI et DMEM/F12K. La courbe de F12K ressemble un peu à celle de RPMI, mais avec des meilleures viabilités : 74%, 54%, 54% et 59% aux jours 13, 20, 34 et 41 respectivement. La courbe de DMEM est très proche de celle de DMEM/F12K aux jours 13 et 20 (viabilités respectives de 75% et 72%), mais aux jours 34 et 41, les viabilités chutent (37% et 51%) et ressemblent à celles du RPMI.

Pour finir, nous avons comparé les photos des sphéroïdes cultivés dans quatre milieux différents. Les sphéroïdes cultivés dans le RPMI ont le plus de débris cellulaires autour du sphéroïde, tandis que ceux dans le milieu DMEM/F12K 1 : 1 semblent ne pas avoir de débris (Figure S1D). Les sphéroïdes dans les milieux DMEM et F12K contiennent un peu de débris cellulaires et se trouvent entre le RPMI et le DMEM/F12K 1 : 1. Donc, les photos semblent être en accord avec les données des courbes de viabilité. Pour conclure, les milieux DMEM/F12K 1 : 1 et DMEM semblent convenir le mieux pour la culture des sphéroïdes de la lignée IGR-N-91.

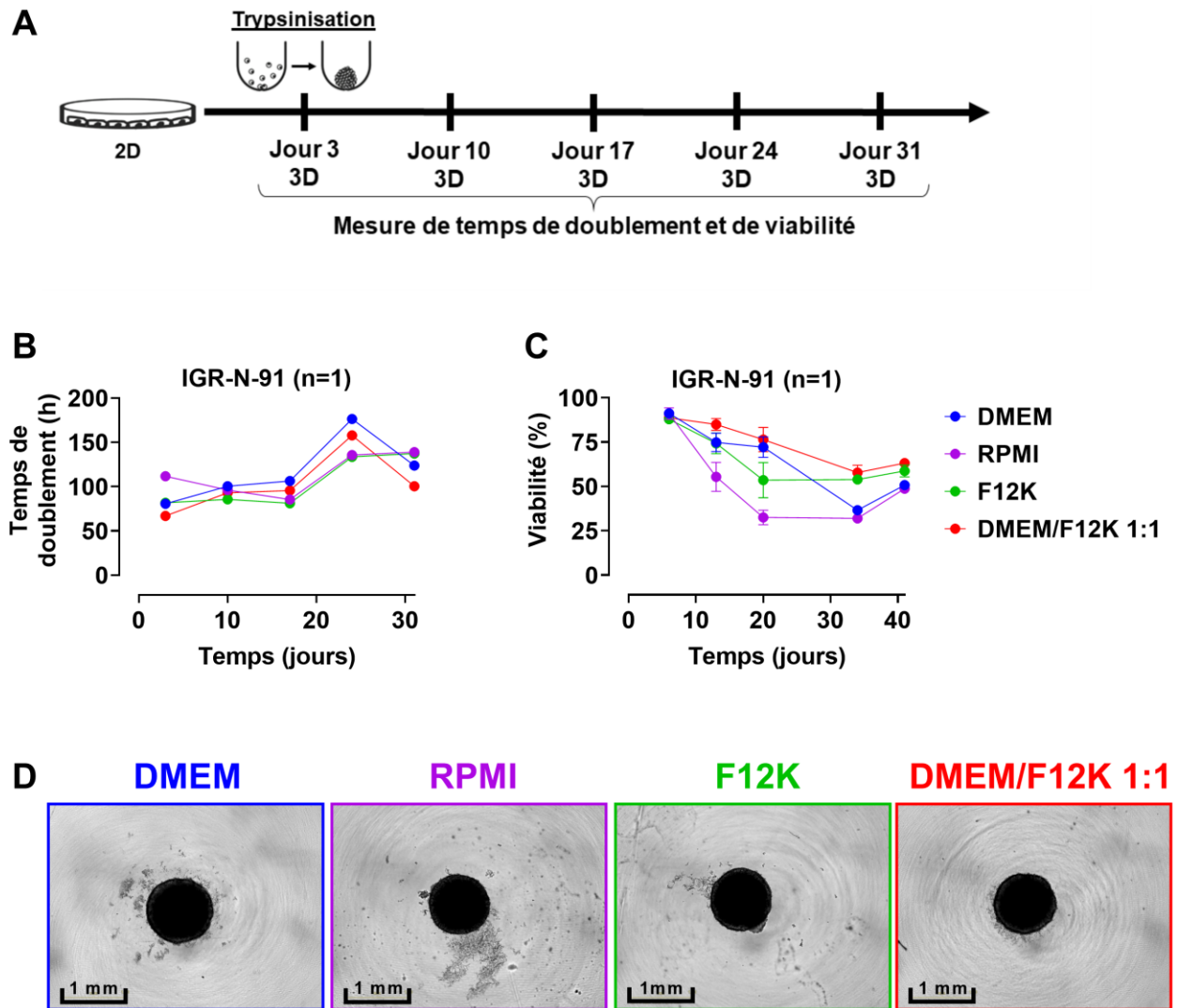


Figure S1. Développement du modèle de culture des sphéroïdes de la lignée IGR-N-91.

A. Schéma résumant la culture cellulaire en 3D à long terme et les expériences effectuées pour restreindre le choix du milieu pour la culture des sphéroïdes de la lignée IGR-N-91. **B.** Le temps de doublement de sphéroïdes a été mesuré lors des passages d'une plaque contenant 96 sphéroïdes (jours 3, 10, 17, 24 et 31) pour les quatre milieux (n=1). **C.** La viabilité des 24 sphéroïdes a été mesurée 3 jours après la formation des sphéroïdes (jours 6, 13, 20, 34 et 41) par le cytomètre en flux Guava pour les quatre milieux (n=1, composé de 24 sphéroïdes regroupés par puits). **D.** Les photos des sphéroïdes ont été prises au jour 41 avec IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System (objectif 4X) pour les quatre milieux (n=1 ; plusieurs sphéroïdes).

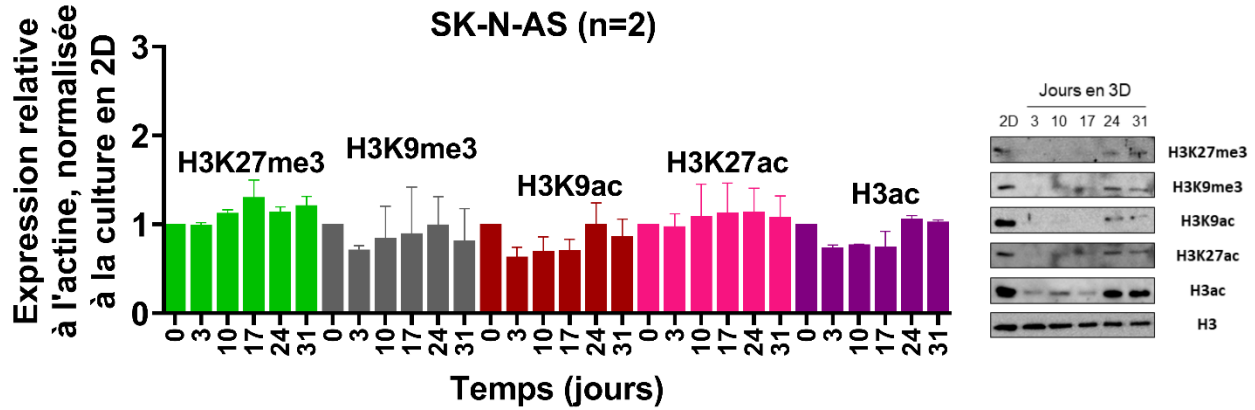


Figure S2. Quantification en 2D et en 3D des changements d'expression de plusieurs marques d'acétylation et de méthylation d'histone H3 reliées aux régulateurs épigénétiques pour le modèle en 3D avec la lignée SK-N-AS.

Quantification de l'expression relative à l'actine et normalisée à la culture en 2D des marques de méthylation (H3K27me3, H3K9me3) et d'acétylation (H3K9ac, H3K27ac et H3ac) de l'histone H3 dans le temps par Western Blot pour la lignée SK-N-AS (n=2).

Tableau S1. IMR-32 : Niveau d'expression des régulateurs épigénétiques dans le temps (n=3)

Temps en 3D (jours)	MYCN	GCN5	EZH2	HDAC1	HDAC2	PRMT1	BRG1	EHMT2
0 (2D)	1	1	1	1	1	1	1	1
3	0,95 ± 0,01	1,0 ± 0,1	1,06 ± 0,02	1,08 ± 0,05	1,03 ± 0,07	1,00 ± 0,03	1,13 ± 0,08	1,5 ± 0,1
10	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,08 ± 0,04	0,98 ± 0,02	1,23 ± 0,07	1,5 ± 0,2
17	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,3	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,3	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,5	2,0 ± 0,3
24	1,44 ± 0,09	1,5 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,72 ± 0,03	1,7 ± 0,3	1,0 ± 0,3	1,6 ± 0,4	1,7 ± 0,2
31	1,40 ± 0,08	1,4 ± 0,3	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,8 ± 0,4	1,0 ± 0,3	1,8 ± 0,5	1,9 ± 0,3

Tableau S2. SK-N-AS : Niveau d'expression des régulateurs épigénétiques dans le temps (n=3)

Temps en 3D (jours)	GCN5	EZH2	HDAC1	HDAC2	PRMT1	BRG1
0 (2D)	1	1	1	1	1	1
3	2,2 ± 0,4	0,9 ± 0,2	3,5 ± 0,9	1,3 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,2
10	3 ± 1	1,1 ± 0,2	4 ± 1	1,5 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2
17	3 ± 1	1,1 ± 0,1	5 ± 2	1,6 ± 0,3	1,02 ± 0,07	1,3 ± 0,2
24	4 ± 1	1,2 ± 0,2	5 ± 1	1,6 ± 0,4	1,02 ± 0,09	1,4 ± 0,3
31	4 ± 1	1,3 ± 0,1	4,7 ± 0,9	1,7 ± 0,5	1,0 ± 0,2	1,7 ± 0,6

Tableau S3. IGR-N-91 : Niveau d'expression des régulateurs épigénétiques dans le temps (n=3)

Temps en 3D (jours)	MYCN	GCN5	EZH2	HDAC1	HDAC2	BRG1
0 (2D)	1	1	1	1	1	1
3	1,08 ± 0,09	1,13 ± 0,05	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,10 ± 0,09	1,6 ± 0,3
10	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,19 ± 0,09	1,7 ± 0,5
17	0,91 ± 0,08	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1
24	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,5 ± 0,3	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,7 ± 0,2
31	1,03 ± 0,09	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,8 ± 0,2

Tableau S4. Liste de 181 composés de la librairie épigénétique

	Nom	Information	Cible précise	Voie de signalisation
1	Veliparib (ABT-888)	Veliparib (ABT-888) is a potent inhibitor of PARP1 and PARP2 with Ki of 5.2 nM and 2.9 nM, respectively. It is inactive to SIRT2. Phase 1/2.	PARP	DNA Damage
2	Belinostat (PXD101)	Belinostat (PXD101) is a novel HDAC inhibitor with IC50 of 27 nM, with activity demonstrated in cisplatin-resistant tumors. Phase 1/2.	HDAC	Epigenetics
3	Danuserib (PHA-739358)	Danuserib (PHA-739358) is an Aurora kinase inhibitor for Aurora A/B/C with IC50 of 13 nM/79 nM/61 nM, modestly potent to Abl, TrkA, c-RET and FGFR1, and less potent to Lck, VEGFR2/3, c-Kit, CDK2, etc. Phase 2.	Aurora Kinase	Cell Cycle
4	SNS-314 Mesylate	SNS-314 Mesylate is a potent and selective inhibitor of Aurora A, Aurora B and Aurora C with IC50 of 9 nM, 31 nM, and 3 nM, respectively. It is less potent to Trk A/B, Flt4, Fms, Axl, c-Raf and DDR2. Phase 1.	Aurora Kinase	Cell Cycle
5	JNJ-7706621	JNJ-7706621 is pan-CDK inhibitor with the highest potency on CDK1/2 with IC50 of 9 nM/4 nM and showing >6-fold selectivity for CDK1/2 than CDK3/4/6. It also potently inhibits Aurora A/B and has no activity on Plk1 and Wee1.	Aurora Kinase	Cell Cycle
6	Ofloxacin	Ofloxacin is a synthetic broad-spectrum antimicrobial agent.	Topoisomerase	DNA Damage
7	ENMD-2076 L-(+)-Tartaric acid	ENMD-2076 L-(+)-Tartaric acid is a tartaric acid of ENMD-2076, selective activity against Aurora A and Flt3 with IC50 of 14 nM and 1.86 nM, 25-fold more selective for Aurora A than Aurora B and less potent to VEGFR2/KDR and VEGFR3, FGFR1 and FGFR2 and PDGFR α . Phase 2.	Aurora Kinase	Cell Cycle
8	Momelotinib (CYT387)	CYT387 is an ATP-competitive inhibitor of JAK1/JAK2 with IC50 of 11 nM/18 nM, ~10-fold selectivity versus JAK3. Phase 1/2.	JAK	JAK/STAT
9	TAK-901	TAK-901 is a novel inhibitor of Aurora A/B with IC50 of 21 nM/15 nM. It is not a potent inhibitor of cellular JAK2, c-Src or Abl. Phase 1.	Aurora Kinase	Cell Cycle
10	WP1066	WP1066 is a novel inhibitor of JAK2 and STAT3 with IC50 of 2.30 μ M and 2.43 μ M in HEL cells; shows activity to JAK2, STAT3, STAT5, and ERK1/2 not JAK1 and JAK3.	JAK	JAK/STAT
11	S-Ruxolitinib (INCB018424)	S-Ruxolitinib is the chirality of INCB018424, which is the first potent, selective, JAK1/2 inhibitor to enter the clinic with IC50 of 3.3 nM/2.8 nM, >130-fold selectivity for JAK1/2 versus JAK3. Phase 3.	JAK	JAK/STAT
12	Roxadustat (FG-4592)	FG-4592 is an HIF α prolyl hydroxylase inhibitor, stabilizes HIF-2 and induces EPO production. Phase 2/3.	HIF	Angiogenesis
13	Iniparib (BSI-201)	BSI-201 (Iniparib, SAR240550) is a PARP1 inhibitor with demonstrated effectiveness in triple-negative breast cancer (TNBC). Phase 3.	PARP	DNA Damage
14	Mocetinostat (MGCD0103)	Mocetinostat (MGCD0103) is a potent HDAC inhibitor with most potency for HDAC1 with IC50 of 0.15 μ M, 2- to 10- fold selectivity against HDAC2, 3, and 11, and no activity to HDAC4, 5, 6, 7, and 8. Phase 1/2.	HDAC	Epigenetics
15	Valproic acid sodium salt	Valproic acid sodium salt (Sodium valproate) is a HDAC inhibitor with IC50 of 0.4 mM and also inhibits GABA-transaminase or succinic semialdehyde dehydrogenase.	HDAC	Epigenetics
16	Ellagic acid	Ellagic acid has antiproliferative and antioxidant property.	Topoisomerase	DNA Damage
17	MC1568	MC1568 is a selective HDAC inhibitor for maize HD1-A with IC50 of 100 nM. It is 34-fold more selective for HD1-A than HD1-B.	HDAC	Epigenetics

18	KW-2449	KW-2449 is a multiple-targeted inhibitor, mostly for Flt3 with IC50 of 6.6 nM, modestly potent to FGFR1, Bcr-Abl and Aurora A; little effect on PDGFR β , IGF-1R, EGFR. Phase 1.	FLT3	Angiogenesis
19	AR-42	AR-42 is an HDAC inhibitor with IC50 of 30 nM. Phase 1.	HDAC	Epigenetics
20	AMG-900	AMG 900 is a potent and highly selective pan-Aurora kinases inhibitor for Aurora A/B/C with IC50 of 5 nM/4 nM /1 nM. It is >10-fold selective for Aurora kinases than p38 α , Tyk2, JNK2, Met and Tie2. Phase 1.	Aurora Kinase	Cell Cycle
21	Sirtinol	Sirtinol is a specific SIRT1 and SIRT2 inhibitor with IC50 of 131 μ M and 38 μ M, respectively.	Sirtuin	Epigenetics
22	IOX2	IOX2 is a potent inhibitor of HIF-1 α prolyl hydroxylase-2 (PHD2) with IC50 of 21 nM, >100-fold selectivity over JMJD2A, JMJD2C, JMJD2E, JMJD3, or the 2OG oxygenase FIH.	HIF	Angiogenesis
23	Panobinostat (LBH589)	Panobinostat (LBH589) is a novel broad-spectrum HDAC inhibitor with IC50 of 5 nM. Phase 3.	HDAC	Epigenetics
24	Abexinostat (PCI-24781)	PCI-24781 is a novel pan-HDAC inhibitor mostly targeting HDAC1 with Ki of 7 nM, modest potent to HDACs 2, 3, 6, and 10 and greater than 40-fold selectivity against HDAC8. Phase 1/2.	HDAC	Epigenetics
25	SRT1720 HCl	SRT1720 is a selective SIRT1 activator with EC50 of 0.16 μ M, but is >230-fold less potent for SIRT2 and SIRT3.	Sirtuin	Epigenetics
26	CYC116	CYC116 is a potent inhibitor of Aurora A/B with Ki of 8.0 nM/9.2 nM, is less potent to VEGFR2 (Ki of 44 nM), with 50-fold greater potency than CDKs, not active against PKA, Akt/PKB, PKC, no effect on GSK-3 α / β , CK2, Plk1 and SAPK2A. Phase 1.	Aurora Kinase	Cell Cycle
27	Ruxolitinib (INCB018424)	INCB018424 is the first potent, selective, JAK1/2 inhibitor to enter the clinic with IC50 of 3.3 nM/2.8 nM, >130-fold selectivity for JAK1/2 versus JAK3. Phase 3.	JAK	JAK/STAT
28	Norfloxacin	Norfloxacin is a broad-spectrum antibiotic.	Topoisomerase	DNA Damage
29	AZD1480	AZD1480 is a novel ATP-competitive JAK2 inhibitor with IC50 of 0.26 nM, selectivity against JAK3 and Tyk2, and to a smaller extent against JAK1. Phase 1.	JAK	JAK/STAT
30	Quercetin	Quercetin is a natural flavonoid present in vegetables, fruit and wine and is a PI3K inhibitor with IC50 of 2.4 – 5.4 mM.	Src,Sirtuin,PKC,PI3K	Epigenetics
31	Fedratinib (SAR302503; TG101348)	TG-101348 (SAR302503) is a selective inhibitor of JAK2 with IC50 of 3 nM, 35- and 334-fold more selective for JAK2 versus JAK1 and JAK3. Phase 1/2.	JAK	JAK/STAT
32	CEP-33779	CEP33779 is a selective JAK2 inhibitor with IC50 of 1.8 nM, >40- and >800-fold versus JAK1 and TYK2.	JAK	JAK/STAT
33	Clevudine	Clevudine is an antiviral drug for the treatment of hepatitis B.	DNA/RNA Synthesis	DNA Damage
34	Trichostatin A (TSA)	Trichostatin A (TSA) is an HDAC inhibitor with IC50 of ~1.8 nM – HDAC8 is the only known member of the HDAC-family that is not affected by TSA. Phase 3.	HDAC	Epigenetics
35	Dacinostat (LAQ824)	LAQ824 (Dacinostat) is a novel HDAC inhibitor with IC50 of 32 nM and is known to activate the p21 promoter.	HDAC	Epigenetics
36	INO-1001 (3-Aminobenzamide)	INO-1001 is a potent inhibitor of PARP with IC50 of <50 nM in CHO cells and a mediator of oxidant-induced myocyte dysfunction during reperfusion. Phase 2.	PARP	DNA Damage

37	ENMD-2076	ENMD-2076 has selective activity against Aurora A and Flt3 with IC50 of 14 nM and 1.86 nM, 25-fold selective for Aurora A than over Aurora B and less potent to VEGFR2/KDR and VEGFR3, FGFR1 and FGFR2 and PDGFR α . Phase 2.	FLT3	Angiogenesis
38	Pirarubicin	Pirarubicin is an anthracycline antibiotic, and also a DNA/RNA synthesis inhibitor by intercalating into DNA and interacts with topoisomerase II, used as antineoplastic agent.	Topoisomerase	DNA Damage
39	Pracinostat (SB939)	SB939 is a potent pan-HDAC inhibitor with IC50 of 40-140 nM with exception for HDAC6. It has no activity against the class III isoenzyme SIRT1. Phase 2.	HDAC	Epigenetics
40	Givinostat (ITF2357)	Givinostat (ITF2357) is a potent HDAC inhibitor for HDAC2, HDAC1B and HDAC1A with IC50 of 10 nM, 7.5 nM and 16 nM. Phase 1/2.	HDAC	Epigenetics
41	Daphnetin	Daphnetin, a natural coumarin derivative, is a protein kinase inhibitor, inhibits EGFR, PKA and PKC with IC50 of 7.67 μ M, 9.33 μ M and 25.01 μ M, respectively, also known to exhibit anti-inflammatory and anti-oxidant activities.	PKA,EGFR,PKC	DNA Damage
42	GSK1070916	GSK1070916 is a reversible and ATP-competitive inhibitor of Aurora B/C with IC50 of 3.5 nM/6.5 nM. It displays >100-fold selectivity against the closely related Aurora A-TPX2 complex. Phase 1.	Aurora Kinase	Cell Cycle
43	Tacedinaline (CI994)	CI-994 (Tacedinaline) is an anti-cancer drug which inhibits HDAC1 with IC50 of 0.57 μ M and causes G1 cell cycle arrest. Phase 3.	HDAC	Epigenetics
44	Entacapone	Entacapone inhibits catechol-O-methyltransferase(COMT) with IC50 of 151 nM.	Histone Methyltransferase	Epigenetics
45	Vorinostat (SAHA; MK0683)	Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) is an HDAC inhibitor with IC50 of \sim 10 nM.	HDAC	Epigenetics
46	Quisinostat (JNJ-26481585) 2HCl	JNJ-26481585 is a novel second-generation HDAC inhibitor with highest potency for HDAC1 with IC50 of 0.11 nM, modest potent to HDACs 2, 4, 10, and 11; greater than 30-fold selectivity against HDACs 3, 5, 8, and 9 and lowest potency to HDACs 6 and 7. Phase 2.	HDAC	Epigenetics
47	Alisertib (MLN8237)	Alisertib (MLN8237) is a selective Aurora A inhibitor with IC50 of 1.2 nM. It has >200-fold higher selectivity for Aurora A than Aurora B. Phase 3.	Aurora Kinase	Cell Cycle
48	CUDC-101	CUDC-101 is a potent multi-targeted inhibitor against HDAC, EGFR and HER2 with IC50 of 4.4 nM, 2.4 nM, and 15.7 nM, and inhibits class I/II HDACs, but not class III, Sir-type HDACs. Phase 1.	HDAC	Epigenetics
49	Resveratrol	Resveratrol is a phytoalexin produced naturally by several plants with anti-cancer, anti-inflammatory, blood-sugar-lowering and other beneficial cardiovascular effects.	Autophagy, Sirtuin	Epigenetics
50	Hesperadin	Hesperadin potently inhibits Aurora B with IC50 of 250 nM. It markedly reduces the activity of AMPK, Lck, MKK1, MAPKAP-K1, CHK1 and PHK while it does not inhibit MKK1 activity <i>in vivo</i> .	Aurora Kinase	Cell Cycle
51	AG-14361	AG14361 is a potent inhibitor of PARP1 with Ki of <5 nM. It is at least 1000-fold more potent than the benzamides.	PARP	DNA Damage
52	Tubastatin A HCl	Tubastatin A is a potent and selective HDAC6 inhibitor with IC50 of 15 nM. It is selective (1000-fold more) against all other isozymes except HDAC8 (57-fold more).	HDAC	Epigenetics
53	CUDC-907	CUDC-907 is a dual PI3K and HDAC inhibitor for PI3K α and HDAC1/2/3/10 with IC50 of 19 nM and 1.7 nM/5 nM/1.8 nM/2.8 nM, respectively. Phase 1.	HDAC	Epigenetics

54	RG108	RG108 is an inhibitor of DNA methyltransferase with IC50 of 115 nM, does not cause trapping of covalent enzymes.	DNA Methyltransferase	Epigenetics
55	Sodium Phenylbutyrate	Sodium Phenylbutyrate is a transcriptional regulators that act by altering chromatin structure via the modulation of HDAC activity.	HDAC	Epigenetics
56	Tozasertib (VX-680; MK-0457)	VX-680 (Tozasertib, MK-0457) is a pan-Aurora inhibitor, mostly against Aurora A with Kiapp of 0.6 nM, less potent towards Aurora B/Aurora C and 100-fold more selective for Aurora A than 55 other kinases. Phase 2.	Aurora Kinase	Cell Cycle
57	Rucaparib (AG-014699; PF-01367338) phosphate	Rucaparib (AG-014699, PF-01367338) is an inhibitor of PARP with Ki of 1.4 nM for PARP1, also showing binding affinity to eight other PARP domains. Phase 1/2.	PARP	DNA Damage
58	AT9283	AT9283 is a potent JAK2/3 inhibitor with IC50 of 1.2 nM/1.1 nM; also potent to Aurora A/B, Abl(T315I). Phase 1/2.	Aurora Kinase	Cell Cycle
59	Decitabine	Decitabine is a potent inhibitor of DNA methylation with IC50 of 438 nM and 4.38 nM in HL-60 and KG1a cells, respectively.	DNA Methyltransferase	Epigenetics
60	Droxinostat	Droxinostat (CMH, 5809354) is a selective inhibitor of HDAC, mostly for HDACs 6 and 8 with IC50 of 2.47µM and 1.46 µM, greater than 8-fold selective against HDAC3 and no inhibition to HDAC1, 2, 4, 5, 7, 9, and 10.	HDAC	Epigenetics
61	Selisistat (EX 527)	EX 527 is a potent and selective SIRT1 inhibitor with IC50 of 38 nM, exhibits >200-fold selectivity against SIRT2 and SIRT3.	Sirtuin	Epigenetics
62	Gandotinib (LY2784544)	LY2784544 is a potent JAK2 inhibitor with IC50 of 3 nM, effective in JAK2V617F, 8- and 20-fold selective versus JAK1 and JAK3. Phase 2.	JAK	JAK/STAT
63	NVP-BSK805 2HCl	NVP-BSK805 is a potent and selective ATP-competitive JAK2 inhibitor with IC50 of 0.5 nM,>20-fold selectivity towards JAK1, JAK3 and TYK2.	JAK	JAK/STAT
64	MK-5108 (VX-689)	MK-5108 (VX-689) is a highly selective Aurora A inhibitor with IC50 of 0.064 nM and is 220- and 190-fold more selective for Aurora A than Aurora B/C, while it inhibits TrkA with less than 100-fold selectivity. Phase 1.	Aurora Kinase	Cell Cycle
65	Baricitinib (LY3009104; INCB028050)	Baricitinib is a selective JAK1 and JAK2 inhibitor with IC50 of 5.9 nM and 5.7 nM, ~70 and ~10-fold selective versus JAK3 and Tyk2, no inhibition to c-Met and Chk2. Phase 3.	JAK	Epigenetics
66	Tranlycypromine (2-PCPA) HCl	Tranlycypromine is a monoamine oxidase inhibitor, which inhibits CYP2A6 with Ki of 0.08 µM and 0.2 µM in cDNA-expressing microsomes and Human Liver Microsomes, respectively.	MAO	Epigenetics
67	Entinostat (MS-275)	Entinostat (MS-275) strongly inhibits HDAC1 and HDAC3 with IC50 of 0.51 µM and 1.7 µM, compared with HDACs 4, 6, 8, and 10. Phase 1/2.	HDAC	Epigenetics
68	MLN8054	MLN8054 is a potent and selective inhibitor of Aurora A with IC50 of 4 nM. It is more than 40-fold selective for Aurora A than B. Phase 1.	Aurora Kinase	Cell Cycle
69	AG-490 (Tyrphostin B42)	AG-490 (Tyrphostin B42) is an inhibitor of EGFR with IC50 of 0.1 µM, 135-fold more selective for EGFR versus ErbB2, also inhibits JAK2 with no activity to Lck, Lyn, Btk, Syk and Src.	JAK	JAK/STAT
70	PFI-1 (PF-6405761)	PFI-1 is a selective BET (bromodomain-containing protein) inhibitor for BRD4 with IC50 of 0.22 µM.	Epigenetic Reader Domain	Epigenetics
71	Aurora A Inhibitor I	Aurora A Inhibitor I is a novel, potent, and selective inhibitor of Aurora A with IC50 of 3.4 nM. It is 1000-fold more selective for Aurora A than Aurora B.	Aurora Kinase	Cell Cycle

72	Azacitidine	Azacitidine is a nucleoside analogue of cytidine that specifically inhibits DNA methylation by trapping DNA methyltransferases.	DNA Methyltransferase	DNA Damage
73	SGLI-1776 free base	SGLI-1776 is a novel ATP competitive inhibitor of Pim1 with IC50 of 7 nM, 50- and 10-fold selective versus Pim2 and Pim3, also potent to Flt3 and haspin. Phase 1.	Pim	JAK/STAT
74	TG101209	TG101209 is a selective JAK2 inhibitor with IC50 of 6 nM, less potent to Flt3 and RET with IC50 of 25 nM and 17 nM, ~30-fold selective for JAK2 than JAK3, sensitive to JAK2V617F and MPLW515L/K mutations.	FLT3	JAK/STAT
75	M344	M344 is a potent HDAC inhibitor with IC50 of 100 nM and able to induce cell differentiation.	HDAC	Epigenetics
76	WHI-P154	WHI-P154 is a potent JAK3 inhibitor with IC50 of 1.8 μM, no activity against JAK1 or JAK2, also inhibits EGFR, Src, Abl, VEGFR and MAPK, prevents Stat3, but not Stat5 phosphorylation.	JAK	JAK/STAT
77	Procainamide HCl	Procainamide HCl is a sodium channel blocker, and also a DNA methyltransferase inhibitor, used in the treatment of cardiac arrhythmias.	DNA Methyltransferase	Epigenetics
78	Olaparib (AZD2281; KU-0059436)	Olaparib (AZD2281, KU0059436) is a selective inhibitor of PARP1/2 with IC50 of 5 nM/1 nM, 300-times less effective against tankyrase-1. Phase 1/2.	PARP	DNA Damage
79	ZM 447439	ZM 447439 is a selective and ATP-competitive inhibitor for Aurora A and Aurora B with IC50 of 110 nM and 130 nM, respectively. It is more than 8-fold selective for Aurora A/B than MEK1, Src, Lck and has little effect against CDK1/2/4, Plk1, Chk1, etc.	Aurora Kinase	Cell Cycle
80	Barasertib (AZD1152-HQPA)	AZD1152-HQPA (Barasertib) is a highly selective Aurora B inhibitor with IC50 of 0.37 nM, ~100 fold more selective for Aurora B over Aurora A.	Aurora Kinase	Cell Cycle
81	2-Methoxyestradiol	2-Methoxyestradiol depolymerizes microtubules and blocks HIF-1α nuclear accumulation and HIF-transcriptional activity. Phase 2.	HIF	Angiogenesis
82	PHA-680632	PHA-680632 is potent inhibitor of Aurora A, Aurora B and Aurora C with IC50 of 27 nM, 135 nM and 120 nM, respectively. It has 10- to 200-fold higher IC50 for FGFR1, FLT3, LCK, PLK1, STK2, and VEGFR2/3.	Aurora Kinase	Cell Cycle
83	PCI-34051	PCI-34051 is a potent and specific HDAC8 inhibitor with IC50 of 10 nM. It has greater than 200-fold selectivity over HDAC1 and 6, more than 1000-fold selectivity over HDAC2, 3, 10.	HDAC	Epigenetics
84	AZ 960	AZ 960 is a novel ATP competitive JAK2 inhibitor with IC50 and Ki of <3 nM and 0.45 nM, 3-fold selectivity of AZ960 for JAK2 over JAK3.	JAK	JAK/STAT
85	Resminostat	Resminostat dose-dependently and selectively inhibits HDAC1/3/6 with IC50 of 42.5 nM/50.1 nM/71.8 nM, less potent to HDAC8 with IC50 of 877 nM.	HDAC	Epigenetics
86	Tofacitinib (CP-690550;Tasocitinib)	Tofacitinib is a novel inhibitor of JAK3 with IC50 of 1 nM, 20- to 100-fold less potent against JAK2 and JAK1.	JAK	JAK/STAT
87	PJ34	PJ-34 is a PARP inhibitor with EC50 of 20 nM and is equally potent to PARP1/2.	PARP	DNA Damage
88	Tofacitinib (CP-690550) Citrate	Tofacitinib citrate (CP-690550 citrate) is a novel inhibitor of JAK3 with IC50 of 1 nM, 20- to 100-fold less potent against JAK2 and JAK1.	JAK	JAK/STAT

89	AZD2461	AZD2461 is a novel PARP inhibitor with low affinity for Pgp than Olaparib. Phase 1.	PARP	DNA Damage
90	(+)-JQ1	(+)-JQ1 is a BET bromodomain inhibitor, with IC50 of 77 nM/33 nM for BRD4(1/2), binding to all bromodomains of the BET family, but not to bromodomains outside the BET family.	Epigenetic Reader Domain	Epigenetics
91	IOX1	IOX1 is a potent and broad-spectrum inhibitor of 2OG oxygenases, including the JmjC demethylases.	Histone Demethylase	Epigenetics
92	PFI-2 HCl	PFI-2 is a potent, selective, and cell-active lysine methyltransferase SETD7inhibitor with IC50 of 0.33 nM and 2 nM, 1000-fold selectivity over other methyltransferases and other non-epigenetic targets.	Histone Methyltransferase	<i>Epigenetics</i>
93	EPZ004777	EPZ004777 is a potent, selective DOT1L inhibitor with IC50 of 0.4 nM.	Histone Methyltransferase	Epigenetics
94	UNC0379	UNC0379 is a selective, substrate competitive inhibitor of N-lysine methyltransferase SETD8 with IC50 of 7.9 μM, high selectivity over 15 other methyltransferases.	Histone Methyltransferase	<i>Epigenetics</i>
95	EI1	EI1 is a potent and selective EZH2 inhibitor with IC50 of 15 nM and 13 nM for EZH2 (WT) and EZH2 (Y641F), respectively.	Histone Methyltransferase	<i>Epigenetics</i>
96	SP2509	SP2509 is a selective histone demethylase LSD1 inhibitor with IC50 of 13 nM, showing no activity against MAO-A, MAO-B, lactate dehydrogenase and glucose oxidase.	Histone Demethylase	<i>Epigenetics</i>
97	SGC707	SGC707 is a potent, selective and cell-active allosteric inhibitor of protein arginine methyltransferase 3 (PRMT3) with IC50 and Kd of 31 nM and 53 nM, respectively.	Histone Methyltransferase	Epigenetics
98	Tubastatin A	Tubastatin A is a potent and selective HDAC6 inhibitor with IC50 of 15 nM. It is selective against all the other isozymes (1000-fold) except HDAC8 (57-fold).	HDAC	Epigenetics
99	PF-CBP1 HCl	PF-CBP1 is a highly selective inhibitor of the bromodomain of CREB-binding protein(CREBBP).It inhibits CREBBP and p300 bromodomains with IC50 of 125 and 363 nM.	Epigenetic Reader Domain	Epigenetics
100	XL019	XL019 is a potent and selective JAK2 inhibitor with IC50 of 2.2 nM, exhibiting >50-fold selectivity over JAK1, JAK3 and TYK2. Phase 1.	JAK	JAK/STAT
101	Zebularine	Zebularine is a DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases, also inhibits cytidinedeaminase with Ki of 2 μM.	DNA Methyltransferase	Epigenetics
102	OG-L002	OG-L002 is a potent and specific LSD1 inhibitor with IC50 of 20 nM, exhibiting 36- and 69-fold selectivity over MAO-B and MAO-A.	Histone Demethylase	Epigenetics
103	RVX-208	RVX-208 is a potent BET bromodomain inhibitor with IC50 of 0.510 μM for BD2, about 170-fold selectivity over BD1. Phase 2.	Epigenetic Reader Domain	Epigenetics
104	OTX015	OTX015 is a potent BET bromodomain inhibitor with EC50 ranging from 10 to 19 nM for BRD2, BRD3, and BRD4. Phase 1.	Epigenetic Reader Domain	Epigenetics
105	A-366	A-366 is a potent and selective G9a/GLP histone lysine methyltransferase inhibitor with IC50 of 3.3nM, exhibiting >1000-fold selectivity for G9a/GLP over 21 other methyltransferases.	Histone Methyltransferase	Epigenetics
106	CPI-169	CPI-169 is a potent, and selective EZH2 inhibitor with IC50 of 0.24 nM, 0.51 nM, and 6.1 nM for EZH2 WT, EZH2 Y641N, and EZH1, respectively.	Histone Methyltransferase	<i>Epigenetics</i>
107	OF-1	OF-1 is a potent inhibitor of BRPF1B and BRPF2 bromodomain with IC50 of 100 nM and 500 nM.	Epigenetic Reader Domain	<i>Epigenetics</i>
108	I-BRD9	I-BRD9 (GSK602) is a potent and selective BRD9 inhibitor with pIC50 of 7.3, while it displayed a pIC50 of 5.3 against BRD4.	Epigenetic Reader Domain	Epigenetics

109	Lomeguatrib	Lomeguatrib is a potent inhibitor of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase with IC50 of 5 nM.	DNA Methyltransferase	Epigenetics
110	Oclacitinib	Oclacitinib is a novel inhibitor of JAK family members with IC50 ranging from 10 to 99 nM and JAK1-dependent cytokines with IC50 ranging from 36 to 249 nM, which did not inhibit a panel of 38 non-JAK kinases.	JAK	JAK/STAT
111	CX-6258 HCl	CX-6258 HCl is a potent, orally efficacious pan-Pim kinase inhibitor with IC50 of 5 nM, 25 nM and 16 nM for Pim1, Pim2, and Pim3.	Pim	JAK/STAT
112	3-deazaneplanocin A (DZNeP) HCl	3-deazaneplanocin A (DZNeP), an analog of adenosine, is a competitive inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase with Ki of 50 pM.	Histone Methyltransferase	Epigenetics
113	NVP-TNKS656	NVP-TNKS656 is a highly potent, selective, and orally active tankyrase inhibitor with IC50 of 6 nM for TNKS2, > 300-fold selectivity against PARP1 and PARP2.	PARP	DNA Damage
114	ML324	ML324 is a selective inhibitor of jumonji histone demethylase (JMJD2) with IC50 of 920 nM.	Histone Demethylase	Epigenetics
115	UNC669	UNC669 is a potent and selective MBT (malignant brain tumor) inhibitor with IC50 of 6 µM for L3MBTL1, 5- and 11-fold selective over L3MBTL3 and L3MBTL4.	Epigenetic Reader Domain	Epigenetics
116	GSK-LSD1 2HCl	GSK-LSD1 2HCl is an irreversible, and selective LSD1 inhibitor with IC50 of 16 nM, > 1000 fold selective over other closely related FAD utilizing enzymes (i.e. LSD2, MAO-A, MAO-B).	Histone Demethylase	Epigenetics
117	MI-2 (Menin-MLL Inhibitor)	MI-2 (Menin-MLL Inhibitor) is a potent menin-MLL interaction inhibitor with IC50 of 446 nM.	Histone Methyltransferase	Epigenetics
118	EPZ015666(GSK3235025)	EPZ015666 is a potent, selective, orally bioavailable PRMT5 inhibitor with IC50 of 5 nM, >20,000-fold selectivity over other PMTs.	Histone Methyltransferase	Epigenetics
119	Ricolinostat (ACY-1215)	Ricolinostat (ACY-1215) is a selective HDAC6 inhibitor with IC50 of 5 nM. It is >10-fold more selective for HDAC6 than HDAC1/2/3 (class I HDACs) with slight activity against HDAC8, minimal activity against HDAC4/5/7/9/11, Sirtuin1, and Sirtuin2.	HDAC	Epigenetics
120	Pacritinib (SB1518)	Pacritinib (SB1518) is a potent and selective inhibitor of Janus Kinase 2 (JAK2) and Fms-Like Tyrosine Kinase-3 (FLT3) with IC50s of 23 and 22 nM, respectively.	FLT3	JAK/STAT
121	HLCL-61 HCl	HLCL-61 hydrochloride is a potent and selective PRMT5 inhibitor for the treatment of acute myeloid leukemia.	Histone Methyltransferase	Epigenetics
122	Pinometostat (EPZ5676)	EPZ-5676 is an S-adenosyl methionine (SAM) competitive inhibitor of protein methyltransferase DOT1L with Ki of 80 pM, demonstrating >37,000-fold selectivity against all other PMTs tested, inhibits H3K79 methylation in tumor. Phase 1.	Histone Methyltransferase	Epigenetics
123	C646	C646 is an inhibitor for histone acetyltransferase, and inhibits p300 with a Ki of 400 nM. Preferentially selective for p300 versus other acetyltransferases.	Histone Acetyltransferase	Epigenetics
124	SGC-CBP30	SGC-CBP30 is a potent CREBBP/EP300 inhibitor with IC50 of 21 nM and 38 nM, respectively.	Epigenetic Reader Domain	Epigenetics
125	PJ34 HCl	PJ34 HCl is the hydrochloride salt of PJ34, which is a PARP inhibitor with EC50 of 20 nM and is equally potent to PARP1/2.	PARP	DNA Damage
126	ME0328	ME0328 is a potent and selective PARP inhibitor with IC50 of 0.89 µM for PARP3, about 7-fold selectivity over PARP1.	PARP	DNA Damage

127	GSK J1	GSK-J1 is a highly potent H3K27 histone demethylase inhibitor with IC50 of 28 nM and 53 nM in cell-free assays for JMJD3 (KDM6B) and UTX (KDM6A), respectively, >10-fold selectivity over other tested demethylases.	Histone Demethylase	<i>Epigenetics</i>
128	MI-3 (Menin-MLL Inhibitor)	MI-3 (Menin-MLL Inhibitor) is a potent menin-MLL interaction inhibitor with IC50 of 648 nM.	Histone Methyltransferase	<i>Epigenetics</i>
129	AZ6102	AZ6102 is a potent TNKS1/2 inhibitor that has 100-fold selectivity against other PARP family enzymes and shows IC50 of 5 nM for Wnt pathway inhibition in DLD-1 cells.	PARP	DNA Damage
130	ZM 39923 HCl	ZM 39923 is an JAK1/3 inhibitor with pIC50 of 4.4/7.1, almost no activity to JAK2 and modestly potent to EGFR; also found to be sensitive to transglutaminase.	JAK	JAK/STAT
131	Mirin	Mirin is a potent Mre11–Rad50–Nbs1 (MRN) complex inhibitor, and inhibits Mre11-associated exonuclease activity.	ATM/ATR	DNA Damage
132	ITSA-1 (ITSA1)	ITSA-1 (ITSA1) is an HDAC activator via TSA suppression, but shows no activity towards other HDAC inhibitors.	HDAC	Epigenetics
133	GSK J4 HCl	GSK J4 HCl is a cell permeable prodrug of GSK J1, which is the first selective inhibitor of the H3K27 histone demethylase JMJD3 and UTX with IC50 of 60 nM and inactive against a panel of demethylases of the JMJ family.	Histone Demethylase	Epigenetics
134	I-BET-762	I-BET-762 is an inhibitor for BET proteins with IC50 of ~35 nM, suppresses the production of proinflammatory proteins by macrophages and blocks acute inflammation, highly selective over other bromodomain-containing proteins.	Epigenetic Reader Domain	Epigenetics
135	MM-102	MM-102 is a high-affinity peptidomimetic MLL1 inhibitor with IC50 of 0.4 μM.	Histone Methyltransferase	Epigenetics
136	CPI-203	CPI-203 is a potent BET bromodomain inhibitor with IC50 of 37 nM for BRD4.	Epigenetic Reader Domain	Epigenetics
137	Nexturastat A	Nexturastat A is a potent and selective HDAC6 inhibitor with IC50 of 5 nM, >190-fold selectivity over other HDACs.	HDAC	Epigenetics
138	Anacardic Acid	Anacardic Acid is a potent inhibitor of p300 and p300/CBP-associated factor histone acetyltransferases, which has antibacterial activity, antimicrobial activity, prostaglandin synthase inhibition, and tyrosinase and lipoxygenase inhibition.	Histone Acetyltransferase	<i>Epigenetics</i>
139	GSK1324726A (I-BET726)	GSK1324726A is a highly selective inhibitor of BET family proteins with IC50 of 41 nM, 31 nM, and 22 nM for BRD2, BRD3 and BRD4.	Epigenetic Reader Domain	<i>Epigenetics</i>
140	ORY-1001 (RG-6016) 2HCl	ORY-1001 (RG-6016) is an orally active and selective lysine-specific demethylase LSD1/KDM1A inhibitor with IC50 of <20 nM, with high selectivity against related FAD dependent aminoxidases. Phase 1.	Histone Demethylase	<i>Epigenetics</i>
141	SMI-4a	SMI-4a is a potent inhibitor of Pim1 with IC50 of 17 nM, modest potent to Pim-2, does not significantly inhibit other serine/threonine- or tyrosine-kinases.	Pim	JAK/STAT
142	GSK591	GSK591 (EPZ015866,GSK3203591) is a potent selective inhibitor of the arginine methyltransferase PRMT5 with IC50 of 11 nM.	Histone Methyltransferase	Epigenetics
143	SGC 0946	SGC 0946 is a highly potent and selective DOT1L methyltransferase inhibitor with IC50 of 0.3 nM, is inactive against a panel of 12 PMTs and DNMT1.	Histone Methyltransferase	Epigenetics
144	RGFP966	RGFP966 is an HDAC3 inhibitor with IC50 of 0.08 μM, exhibits > 200-fold selectivity over other HDAC.	HDAC	Epigenetics
145	SGI-1027	SGI-1027 is a DNMT inhibitor with IC50 of 6, 8, 7.5 μM for DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B	DNA Methyltransferase	Epigenetics

146	MS436	MS436 is a selective BET bromodomain inhibitor with IC50 of <0.085 μ M and 0.34 μ M for BRD4 (1) and BRD4 (2).	Epigenetic Reader Domain	<i>Epigenetics</i>
147	MG149	MG149 is a potent histone acetyltransferase inhibitor with IC50 of 74 μ M and 47 μ M for Tip60 and MOF.	Histone Acetyltransferase	<i>Epigenetics</i>
148	BRD4770	BRD4770 is a histone methyltransferase G9a inhibitor with IC50 of 6.3 μ M, and induces cell senescence.	Histone Methyltransferase	<i>Epigenetics</i>
149	Niraparib (MK-4827) tosylate	MK-4827(Niraparib) tosylate is a selective inhibitor of PARP1/PARP2 with IC50 of 3.8 nM/2.1 nM.	PARP	DNA Damage
150	GSK2879552 2HCl	GSK2879552 2HCl is a potent, selective, orally bioavailable, irreversible LSD1 inhibitor with Kiapp of 1.7 μ M. Phase 1.	Histone Demethylase	Epigenetics
151	BIX 01294	BIX01294 is an inhibitor of G9a histone methyltransferase with IC50 of 2.7 μ M, reduces H3K9me2 of bulk histones, also weakly inhibits GLP (primarily H3K9me3), no significant activity observed at other histone methyltransferases.	Histone Methyltransferase	Epigenetics
152	MS023	MS023 is a potent, selective, and cell-active Type I PRMT inhibitor with IC50 of 30 nM, 119 nM, 83 nM, 4 nM, and 5 nM for PRMT1, PRMT3, PRMT4, PRMT6 and PRMT8, respectively.	Histone Methyltransferase	Epigenetics
153	UNC1215	UNC1215 is a potent and selective MBT (malignant brain tumor) antagonist, which binds L3MBTL3 with IC50 of 40 nM and Kd of 120 nM, 50-fold selective versus other members of the human MBT family.	Epigenetic Reader Domain	Epigenetics
154	GSK2801	GSK2801 is a selective bromodomains inhibitor with IC50 of 257 nM and 136 nM,	Epigenetic Reader Domain	<i>Epigenetics</i>
155	JIB-04	JIB-04 is a pan-selective Jumonji histone demethylase inhibitor with IC50 of 230, 340, 855, 445, 435, 1100, and 290 nM for JARID1A, JMJD2E, JMJD3, JMJD2A, JMJD2B, JMJD2C, and JMJD2D in cell-free assays, respectively.	Histone Demethylase	<i>Epigenetics</i>
156	PFI-3	PFI-3 is a selective chemical probe for SMARCA bromodomains, including SMARCA2, SMARCA4 and PB1(5) bromodomains.	Epigenetic Reader Domain	<i>Epigenetics</i>
157	Decernotinib (VX-509)	Decernotinib (VX-509) is a potent and selective JAK3 inhibitor with Ki of 2.5 nM, >4-fold selectivity over JAK1, JAK2, and TYK2, respectively. Phase 2/3.	JAK	JAK/STAT
158	Filgotinib (GLPG0634)	Filgotinib (GLPG0634) is a selective JAK1 inhibitor with IC50 of 10 nM, 28 nM, 810 nM, and 116 nM for JAK1, JAK2, JAK3, and TYK2, respectively. Phase 2.	JAK	JAK/STAT
159	Remodelin	Remodelin is a potent acetyl-transferase NAT10 inhibitor.	Histone Acetyltransferase	<i>Epigenetics</i>
160	GSK503	GSK503 is a potent and specific EZH2 methyltransferase inhibitor.	Histone Methyltransferase	<i>Epigenetics</i>
161	UPF 1069	UPF 1069 is a selective PARP2 inhibitor with IC50 of 0.3 μ M. It is ~27-fold selective against PARP1.	PARP	DNA Damage
162	Mitomycin C	Mitomycin C is an antineoplastic antibiotic by inhibiting DNA synthesis, used to treat different cancers.	DNA/RNA Synthesis	DNA Damage
163	AZD1208	AZD1208 is a potent, and orally available Pim kinase inhibitor with IC50 of 0.4 nM, 5 nM, and 1.9 nM for Pim1, Pim2 and Pim3. Phase 1.	Pim	JAK/STAT
164	Bromosporine	Bromosporine is a broad spectrum inhibitor for bromodomains with IC50 of 0.41 μ M, 0.29 μ M, 0.122 μ M and 0.017 μ M for BRD2, BRD4, BRD9 and CECR2, respectively.	Epigenetic Reader Domain	Epigenetics

165	RG2833 (RGFP109)	RG2833 (RGFP109) is a brain-penetrant HDAC inhibitor with IC50 of 60 nM and 50 nM for HDAC1 and HDAC3, respectively.	HDAC	Epigenetics
166	TMP269	TMP269 is a potent, selective class IIa HDAC inhibitor with IC50 of 157 nM, 97 nM, 43 nM and 23 nM for HDAC4, HDAC5, HDAC7 and HDAC9.	HDAC	Epigenetics
167	4SC-202	4SC-202 is a selective class I HDAC inhibitor with IC50 of 1.20 μ M, 1.12 μ M, and 0.57 μ M for HDAC1, HDAC2, and HDAC3. Also displays inhibitory activity against Lysine specific demethylase 1 (LSD1). Phase 1.	HDAC	Epigenetics
168	UNC0631	UNC0631 is a potent histone methyltransferase G9a inhibitor with IC50 of 4 nM.	Histone Methyltransferase	Epigenetics
169	CPI-360	CPI-360 is a potent, selective, and SAM-competitive EZH1 inhibitor with IC50 of 102.3 nM, >100-fold selectivity over other methyltransferases.	Histone Methyltransferase	Epigenetics
170	EPZ011989	EPZ011989 is a potent, selective, orally bioavailable EZH2 inhibitor with Ki of <3 nM.	Histone Methyltransferase	Epigenetics
171	Scriptaid	Scriptaid is an inhibitor of HDAC. It shows a greater effect on acetylated H4 than H3.	HDAC	DNA Damage
172	BI-7273	BI-7273 is a potent, selective, and cell-permeable BRD9 BD Inhibitor.	Epigenetic Reader Domain	Epigenetics
173	Gemcitabine HCl	Gemcitabine HCl is a DNA synthesis inhibitor with IC50 of 50 nM, 40 nM, 18 nM, 12 nM in PANC1, MIAPaCa2, BxPC3 and Capan2 cells.	DNA/RNA Synthesis	DNA Damage
174	Carboplatin	Carboplatin is a DNA synthesis inhibitor by binding to DNA and interfering with the cell's repair mechanism in A2780, SKOV-3, IGROV-1, and HX62 cells.	DNA/RNA Synthesis	DNA Damage
175	Daptomycin	Daptomycin is a novel antibiotic with rapid <i>in vitro</i> bactericidal activity against gram-positive organisms.	DNA/RNA Synthesis	DNA Damage
176	Mizoribine	Mizoribine is an imidazole nucleoside, selectively inhibits inosine monophosphate synthetase and guanosine monophosphate synthetase.	DNA/RNA Synthesis	DNA Damage
177	Cytarabine	Cytarabine is an antimetabolic agent and DNA synthesis inhibitor with IC50 of 16 nM in wild-type CCRF-CEM cells.	DNA/RNA Synthesis	DNA Damage
178	Nedaplatin	Nedaplatin is a derivative of cisplatin and DNA damage agent for tumor colony forming units with IC50 of 94 μ M.	DNA/RNA Synthesis	DNA Damage
179	Procarbazine HCl	Procarbazine HCl is a hydrochloride salt form of procarbazine which is a polyfunctional alkylating compound, used for the treatment of Hodgkin's lymphoma.	DNA/RNA Synthesis	DNA Damage
180	Blasticidin S HCl	Blasticidin S HCl is a nucleoside antibiotic isolated from <i>Streptomyces girseochromogenes</i> , and acts as a DNA and protein synthesis inhibitor, used to select transfected cells carrying bsr or BSD resistance genes.	DNA/RNA Synthesis	DNA Damage
181	APTSTAT3-9R	APTSTAT3-9R is a specific STAT3-binding peptide with addition of a cell-penetrating motif. The treatment of APTSTAT3-9R in various types of cancer cells blocks STAT3 phosphorylation and reduces expression of STAT targets.	STAT	JAK/STAT