

Université de Montréal

Développement de modèles précliniques de sphéroïdes de neuroblastome en co-culture avec des cellules NK

Par

Mardhy Mohamed Walid

Département de pharmacologie et de physiologie, Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise

En pharmacologie, option générale

31 août 2022

© Mardhy Mohamed Walid, 2022

Université de Montréal

Département de pharmacologie et de physiologie, Faculté de médecine

Ce mémoire (ou cette thèse) intitulé(e)

Développement de modèles précliniques de sphéroïdes de neuroblastome en co-culture avec des cellules NK

Présenté par

Mardhy Mohamed Walid

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Dr Michèle Brochu

Président-rapporteur

Dr Noël Raynal

Directeur de recherche

Dr Gilles Hickson

Membre du jury

Résumé

Le neuroblastome pédiatrique à haut risque est incurable malgré l'intensification des traitements. Chez le patient, les cellules de neuroblastome échappent à l'activité anticancéreuse des cellules immunitaires Natural Killer (NK). Or, lorsque cultivées *in vitro* en monocouche (2D), les cellules de neuroblastomes redeviennent sensibles à l'activité cytotoxique des cellules NK ce qui ne reflète pas leur résistance dans les tumeurs *in situ*. Nous faisons l'hypothèse que lorsque cultivées en 3D sous forme de sphéroïdes, les cellules de neuroblastome pourraient retrouver certaines caractéristiques qui les rendraient plus représentatives des tumeurs *in situ* au niveau immunologique. Ainsi, un tel modèle préclinique pourrait mieux refléter la résistance aux cellules NK et servir de modèle de criblage pour la découverte de médicaments potentialisant la cytotoxicité des cellules NK. Pour répondre à cette question, nous avons développé un système de culture cellulaire 3D utilisant plusieurs lignées cellulaires de neuroblastome. À ce système, une co-culture en 3D avec une lignée de cellules Natural Killer (NK92) a été mise en place. Nous avons mis en évidence que les sphéroïdes de neuroblastome présentent des changements d'expression de certains gènes qui sont retrouvés chez les patients ainsi qu'une plus grande résistance à l'activité cytotoxique des cellules NK92 en comparaison avec les lignées en monocouche. Les co-cultures de sphéroïdes ont été exposées à des inhibiteurs de protéines impliquées à différents niveaux de l'épigénome afin de découvrir des médicaments qui sensibiliseraient les cellules de neuroblastome à l'activité cytotoxique des NK92. Une différence dans la sensibilité aux médicaments entre les sphéroïdes et les cellules en 2D ainsi qu'en monoculture ou en co-culture a été observée et certains composés ont été identifiés en vue de potentialiser l'activité des cellules NK92. Ainsi, nos études ont permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance des cellules du neuroblastome à l'activité cytotoxique des cellules NK dans un modèle plus représentatif de la tumeur *in situ*.

Mots-clés : tumeurs pédiatriques, neuroblastome, sphéroïdes, culture cellulaire 3D, coculture, cellules Natural Killer, cytotoxicité, épigénétique, pharmacologie, criblage de composés.

Abstract

High-risk pediatric neuroblastoma remains incurable despite intensified treatments. In patients, neuroblastoma cells evade the anti-cancer activity of Natural Killer (NK) immune cells. However, when cultured *in vitro* in a monolayer (2D), neuroblastoma cells become sensitive to the cytotoxic activity of NK cells, which does not reflect their resistance in tumors *in situ*. We hypothesize that when cultured in 3D in the form of spheroids, neuroblastoma cells could regain certain characteristics that would make them representative of tumors *in situ* at the immunological level. Thus, such a preclinical model could better reflect NK cell resistance and serve as a screening model for drug discovery to discover a treatment that can potentiate NK cell cytotoxicity. To answer this question, we developed a 3D cell culture system using several neuroblastoma cell lines. To this system, a 3D coculture model with a Natural Killer (NK92) cell line was set up. We have shown that neuroblastoma spheroids develop changes in the expression of certain genes that are found in patients as well as greater resistance to NK92 cells compared to monolayer cell lines. Spheroid cocultures were exposed to inhibitors of proteins involved at different levels of the epigenome to discover drugs that would sensitize neuroblastoma cells to the cytotoxic activity of NK92. A difference in drug sensitivity between spheroids and cells in 2D as well as in monoculture or coculture was observed and some compounds were identified to potentiate the activity of NK92 cells. Thus, our studies have provided a better understanding of the mechanisms involved in the resistance of neuroblastoma cells to the cytotoxic activity of NK cells in a more representative model of the tumor *in situ*.

Keywords: pediatric tumor, neuroblastoma, spheroids, 3D cell culture, coculture, Natural Killer cells, cytotoxicity, epigenetic, pharmacology, drug screening.

Table des matières

Résumé.....	5
Abstract.....	7
Table des matières.....	9
Liste des tableaux.....	13
Liste des figures.....	15
Liste des sigles et abréviations.....	17
Remerciements.....	27
Chapitre 1: Introduction.....	30
1 – Le neuroblastome.....	30
1.1 Statistiques et incidences.....	30
1.2 Aspect clinique et caractéristiques phénotypiques.....	31
1.3 Classification du neuroblastome.....	33
1.4 Caractérisation moléculaire et cellulaire dans le neuroblastome.....	35
1.5 Altérations génétiques.....	38
1.5.1 Amplification des principaux oncogènes.....	38
1.5.1.1 MYCN.....	38
1.5.1.2 ALK.....	41
1.5.2 Aberrations chromosomiques.....	42
1.5.2.1 Gain du chromosome 17q.....	42
1.5.2.2 Perte du chromosome 11q.....	42
1.6 Altérations épigénétiques.....	43
1.6.1 Méthylation de l'ADN.....	44

1.6.2 Modifications post-traductionnelles des histones.....	46
1.6.2.1 L'acétylation des histones.....	46
1.6.2.2 La méthylation des histones : le complexe « polycomb repressive complex 2 » (PRC2)	47
1.6.3 Circuit de régulation de la transcription	49
2 – Le microenvironnement tumoral	53
2.1.1 Cellules non-immunitaires	53
2.1.2 Cellules immunitaires.....	54
2.1.3 Interactions cellulaires par la sécrétion de différents facteurs	56
2.2 Rôle des cellules NK dans le neuroblastome	57
2.2.1 Développement des cellules NK.....	57
2.2.2 Rôle des cytokines dans l'activité des cellules NK	59
2.2.3 Balance de signaux activateurs et inhibiteurs dans l'activation des cellules NK	60
2.2.3.1 Description des récepteurs activateurs NKG2D et DNAM1	61
2.2.3.2 Description du récepteur inhibiteur NKG2A	62
2.2.3.3 Activité cytotoxique	63
2.2.4 Inhibition de la cytotoxicité des cellules NK dans le neuroblastome	63
2.2.5 Régulation de la transcription modulant l'activité des cellules NK dans le cancer ..	67
3 – Thérapies contre le neuroblastome	69
3.1 Stratégies ciblant l'amplification de MYCN.....	70
3.2 Traitements épigénétiques ciblant les DNMT et les HDAC.....	70
3.3 Traitements d'immunothérapie.....	72
3.4 Limites des traitements actuels	74
3.4.1 Résistance à la chimiothérapie	74

3.4.2 Développement d'effets secondaires	75
3.5 Immunothérapie basée sur les cellules NK	75
3.5.1 Expansion allogénique et autologue	76
3.5.2 CAR-NK	77
3.5.3 Médicaments améliorant l'activité des cellules NK	77
3.5.4 Avantages comparés aux lymphocytes T	78
4 – Développement d'un modèle préclinique représentatif de la tumeur in-situ	81
4.1 Limites de la culture en monocouche (modèle 2D)	81
4.2 Développement de modèles favorisant les interactions cellulaires	81
4.3 Développement de modèle récapitulant les interactions paracrines	84
4.4 Criblage à haut débit (HTS) et découverte de médicaments	85
Hypothèse et objectifs	87
Chapitre 2: Matériel et méthodes.....	89
Chapitre 3: Résultats	99
Chapitre 4: Discussion	141
Conclusion et perspectives.....	150
Références bibliographiques.....	152
Annexes	169

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1. –	Système de stadification du neuroblastome selon l'INSS. Adaptée de (15).	35
Tableau 2. –	Rôle de l'activité des récepteurs/ligands de la synapse immunologique dans l'activité et le contrôle de différentes tumeurs. Adaptée de (129)	67

Matériels et méthodes

Tableau 3. –	Listes des anticorps primaires ainsi que leur concentration utilisée dans les expériences d'expression protéique.	94
Tableau 4. –	Listes des anticorps primaires ainsi que leur concentration utilisée dans les expériences d'expression des marques d'acétylation et de méthylation sur l'histone H3.	95

Annexe

Tableau 5. –	Caractéristiques des 181 composés de la librairie épigénétique.....	171
--------------	---	-----

Liste des figures

Introduction :

Figure 1. – Distribution des nouveaux cas de cancer chez les enfants âgés de 0 à 14 ans au Canada entre 2013 et 2017.....	30
Figure 2. – Sites de développement et de migration métastatique du neuroblastome.....	32
Figure 3. – Développement du neuroblastome à partir de la crête neurale.....	36
Figure 4. – Représentation des altérations génétiques et épigénétiques associées à la carcinogénèse. 37	
Figure 5. – Rôle de MYCN dans le maintien et le développement du neuroblastome.	40
Figure 6. – Modifications de la structure de la chromatine dans les cellules de neuroblastome..	44
Figure 7. – Mécanisme d'action de la caspase 8 via le récepteur de mort cellulaire.....	45
Figure 8. – Composition du complexe PRC2 et liaison à l'histone H3K27me3.	48
Figure 9. – Modélisation du circuit de régulation de base dans le neuroblastome.	50
Figure 10. – Composition tumorale d'une tumeur de neuroblastome en fonction de l'amplification de MYCN.....	55
Figure 11. – Effets du TME sur les propriétés tumorales.....	57
Figure 12. – Développement des cellules NK à partir des cellules souches hématopoïétiques (HSC) dans la moelle osseuse.....	58
Figure 13. – Récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK ainsi que leurs ligands.....	61
Figure 14. – Interaction du TME avec les cellules NK et les cellules de neuroblastome..	64
Figure 15. – Stratégies pour augmenter l'activité des cellules NK par transfert dans le but de développer une immunothérapie dépendante des cellules NK..	76

Résultats :

Figure 1. – Caractérisation des modèles de sphéroïdes des lignées de neuroblastome SK-N-AS, IMR-32 et IGR-N91.....	102
--	-----

Figure 2. – Caractérisation de l’expression protéique de plusieurs marqueurs de la lignée SK-N-AS en fonction du temps de culture en sphéroïdes.....	105
Figure 3. – Caractérisation de l’expression protéique de plusieurs marqueurs de la lignée IMR-32 en fonction du temps de culture en sphéroïdes.	107
Figure 4. – Caractérisation de l’expression protéique de plusieurs marqueurs de la lignée IGR-N91 en fonction du temps de culture en sphéroïdes	108
Figure 5. – Analyse différentielle du profil d’expression génique de la lignée SK-N-AS en 2D comparativement au 3D à 24 jours de culture	111
Figure 6. – Analyse différentielle du profil d’expression génique de la lignée IMR-32 en 2D comparativement au 3D à 24 jours de culture	113
Figure 7. – Analyse différentielle entre la culture 2D et 3D au jours 24 des gènes différentiellement exprimés dans les lignées SK-N-AS et IMR-32.....	115
Figure 8. – Analyse différentielle du profil d’expression de plusieurs gènes reliés au développement et à la différenciation des cellules de la crête neurale dans les lignées de neuroblastome SK-N-AS et IMR-32 en 2D comparativement au 3D après 24 jours de culture.....	118
Figure 9. – Analyse différentielle du profil d’expression de plusieurs gènes épigénétiques dont les marques de méthylation et d’acétylation dans les lignées de neuroblastome SK-N-AS et IMR-32 en 2D comparativement au 3D à 24 jours de culture.....	119
Figure 10. – Quantification des niveaux globaux d’acétylation et de méthylation sur l’histone H3 en fonction du temps de culture en 3D comparativement au modèle en 2D dans les lignées SK-N-AS et IMR-32.....	121
Figure 11. – Caractérisation de l’expression protéique de marqueurs immunologiques de la lignée SK-N-AS en fonction du temps de culture en sphéroïdes	124

Figure 12. – Caractérisation de l’expression protéique de marqueurs immunologiques de la lignée IMR-32 en fonction du temps de culture en sphéroïdes	126
Figure 13. – Caractérisation de l’expression protéique de marqueurs immunologiques de la lignée IGR-N91 en fonction du temps de culture en sphéroïdes	127
Figure 14. – Analyse différentielle du profil d’expression de plusieurs gènes reliés à la réponse immunologique des cellules NK dans les lignées de neuroblastome SK-N-AS et IMR-32 en 2D comparativement au 3D à 24 jours de culture.....	129
Figure 15. – Analyse et impact du milieu conditionné des cellules SK-N-AS en 2D et en 3D au jour 24 sur les caractéristiques cellulaires des cellules NK92.....	131
Figure 16. – Analyse de deux méthodes de passage à la co-culture en sphéroïdes avec des cellules SK-N-AS et NK92.....	134
Figure 17. – Caractérisation de la résistance aux cellules NK92 à travers le temps de co-culture des sphéroïdes des cellules SK-N-AS comparativement à la culture 2D.....	136
Figure 18. – Criblage de 181 composés induisant des changements épigénétiques sur le modèle en co-culture composés de cellules SK-N-AS et NK92 à un ratio 1:1.....	139

Annexes :

Figure 1. – Analyse différentielle du profil d’expression de plusieurs gènes impliqués dans la méthylation et l’acétylation dans les lignées de neuroblastome SK-N-AS et IMR-32 en 2D comparativement au 3D à 24 jours de culture.....	169
Figure 2. Analyse différentielle de l’expression des gènes entre la culture 2D et 3D au jours 24 dans les lignées SK-N-AS et IMR-32.....	170

Liste des sigles et abréviations

ADCC : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendantes des anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALK : Kinase du lymphome anaplasique

AP-1 : Protéine activatrice 1

ARN: Acide ribonucléique

ARNi: Acide ribonucléique interférant

BDNF : facteur neurotrope dérivé du cerveau

BET : bromodomaine et extraterminal

BM: moelle osseuse

BRD: bromodomaine contenant une protéine

CAF : fibroblaste associé au cancer

CAR : récepteur à antigène chimérique

CDK : kinase dépendante de la cycline

CE : cellule endothéliale

CLP : progéniteur lymphoïde commun

CRC : circuit régulateur central

CREB : protéine de liaison de l'élément de réponse à l'adénosine monophosphate de cycline

CSC : cellule souche cancéreuse

CSM: cellule souche mésenchymateuse

DC: cellule dendritique

DNAM: molécule d'accessoire DNAX

DNMT : ADN méthyltransférase

ECM: matrice extracellulaire

ERK: kinase régulée par le signal

FBS: sérum bovin foetal

FGF: facteur de croissance des fibroblastes

FISH: hybridation in situ par fluorescence

GD2: disialoganglioside

GM-CSF: facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages

GWAS : étude d'association pangénomique

HAT: histone acétyltransférase

HDAC: histone désacétylase

HDM: histone déméthylase

HLH: hélice-boucle-hélice

HMT: histone méthyltransférase

HSC: cellule souche hématopoïétique

HTS : criblage haut-débit

ICAM : molécule d'adhésion intercellulaire

IDO: indoleamine

IFN: interferon

Ig : immunoglobuline

IGF: facteur de croissance dépendant de l'insuline

IL : interleukine

ILC : cellule lymphoïde innée

INPC : classification internationale de la pathologie du neuroblastome

INSS : système international de stadification du neuroblastome

IRM : imagerie par résonance magnétique

ITIM : inhibiteur à base de tyrosine des immunorécepteurs

Jak: janus kinase

Kdm: lysine déméthylase

LDLa : lipoprotéine de basse densité de type A

LN : ganglion lymphatique

MHC : complexe majeur d'histocompatibilité

MIBG : méta-iodobenzylguanidine

MIC: protéine à chaîne reliée au MHC de classe I

MKI: index mitose-caryorrhexis

NB: neuroblastome

NFAT2: facteur nucléaire des lymphocytes T activés

NGF: facteur de croissance nerveux

NK: cellule natural killer

NKT: cellule natural killer T

NT3: neurotrophine 3

OCT : composé de coupe à température optimale

PBL : lymphocyte du sang périphérique

PGE: prostaglandine E

PI: iodure de propidium

Pi3K: phosphatidylinositol 3-kinase

PRC2: complexe répressif polycomb 2

PTM : modification post-traductionnelle

SC: cellule de Schwann

SNC: système nerveux central

SNP: système nerveux périphérique

STAT : signal de la transduction et activateur de la transcription

TAM : macrophage associé aux tumeurs

TCR: récepteur des cellules T

TDM: tomodensitométrie

TET: translocation ten-eleven

TGF: facteur de croissance transformant

TH: tyrosine hydroxylase

TME: microenvironnement tumoral

TNF : facteur de nécrose tumorale

TRAIL: ligand du facteur de nécrose tumorale induisant l'apoptose

VCAM: molécule d'adhésion de cellules vasculaires

VE: vésicule extracellulaire

VEGF: facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Zip : leucine zipper

Je dédie ce mémoire

À ma famille,

Ma mère,

Mon père et

Mon frère

Mes meilleurs amis,

Tous ceux qui ont participé à l'élaboration de mon savoir et à de ma passion

Remerciements

Avant tout, ce fut un plaisir de travailler et d'acquérir une formation enrichissante d'un point de vue personnel et professionnel aux côtés du **Dr Noël Raynal**. Je tiens à le remercier pour son aide, ses conseils, son soutien, ses encouragements ainsi que sa patience durant mon stage de fin de baccalauréat en sciences biomédicales et durant mes 2 années de maîtrise dans son laboratoire. Pendant les moments les plus compliqués, ses encouragements et sa positivité m'ont permis de rebondir et de retrouver une motivation encore plus forte.

Je voudrai également remercier le **département de pharmacologie et de physiologie de l'Université de Montréal** ainsi que tous **les professeurs** ayant contribué à la formation de mon savoir et du soutien qu'ils m'ont apporté durant ces 2 ans. Je suis aussi très reconnaissant d'être évalué par le **Dr Gilles Hickson** et le **Dr Michèle Brochu** et je les remercie pour leur temps et leur aide pour perfectionner mon mémoire. Merci pour votre expertise !

Mes collègues de maîtrise qui sont devenus mes ami(e)s, **Emmanuel Sy** et **Mariya Kryvoshey**, sont une des principales raisons de mon bien être moral dans le laboratoire. Mariya, on a travaillé ensemble sur le neuroblastome et le modèle 3D, on a surpassé plusieurs échecs et points difficiles à élucider ensemble. Je suis très reconnaissant d'avoir passé ces moments avec toi avec toujours l'esprit combatif de réussir « avant minuit ». Manu, on a passé notre stage et notre maîtrise ensemble, on a partagé les bons moments et les difficultés ensemble en essayant de se rassurer et de se motiver. Nos conversations allant de la science à la philosophie sur la vie pendant nos pauses ont ajouté un côté critique et un recul à notre simple vie d'étudiant à la maîtrise. Merci à vous !

Aussi, je remercie grandement les deux post doctorants **Antoine Méant** et **Anaïs Darracq**. Merci Antoine de m'avoir inculqué l'art du Western Blot et de l'analyse protéique. Tu as été là pour répondre à toutes mes questions même si elles n'étaient pas toujours pertinentes. Anaïs, notre fin de maîtrise n'aurait pas été pareil sans toi. Ton aide a été l'une des plus précieuses. On a appris à aimer travailler et rédiger à tes côtés. L'énergie positive que tu « secrète » nous a apporté le dernier souffle dont on avait besoin. Merci encore d'avoir pris le temps de répondre à

nos questions et d'avoir lu certaines parties de mon mémoire dont l'introduction pour me faire part de tes commentaires. Merci d'être comme tu es !

À notre prochain sushi !

Je remercie aussi les laboratoires du **Dr Serge McGraw** et du **Dr Christian Beauséjour** pour l'aide qu'ils m'ont apporté. Un grand merci à **Etienne Collette**, un stagiaire du laboratoire du Dr McGraw pour toute l'aide apportée aux analyses de séquençage de l'ARN. Merci aussi à **Paola** et **Marie-Lyn Goyer** du laboratoire du Dr Beauséjour pour votre aide concernant la culture compliquée des cellules NK92.

Je remercie toute ma famille, mes parents ainsi que mon frère pour toute leur confiance, l'encouragement et l'amour qu'ils m'ont donné tout au long de mes études et ce depuis mon premier jour d'école. Vous avez fait de moi ce que je suis aujourd'hui. J'espère vous rendre fier de moi !

J'aimerais remercier tous mes amis qui ont été là pour moi et avec qui j'ai passé mes meilleurs moments qui sont loin d'être finis. Particulièrement à mon meilleur ami **Yannis** qui a suivi mon parcours de maîtrise en ce temps de pandémie et qui a participé à mes pires et à mes meilleurs moments. Personne d'autre n'a suivi ces deux ans d'aussi près. Ta présence à ma présentation orale au congrès Gabriel Plaa et ton enthousiasme m'ont beaucoup aidé. Merci pour tes encouragements et pour la force que tu m'as donné !

Chapitre 1 : Introduction

1 – Le neuroblastome

1.1 Statistiques et incidences

Le neuroblastome (NB) est la tumeur extra-crânienne infantile et du système nerveux sympathique la plus courante (97%) avec un diagnostic en moyenne à l'âge de 17 mois (1). L'incidence en 2017 est de 10,5 cas par million d'enfants qui ont moins de 15 ans en Amérique du Nord et en Europe en excluant les variabilités ethniques et géographiques (2).

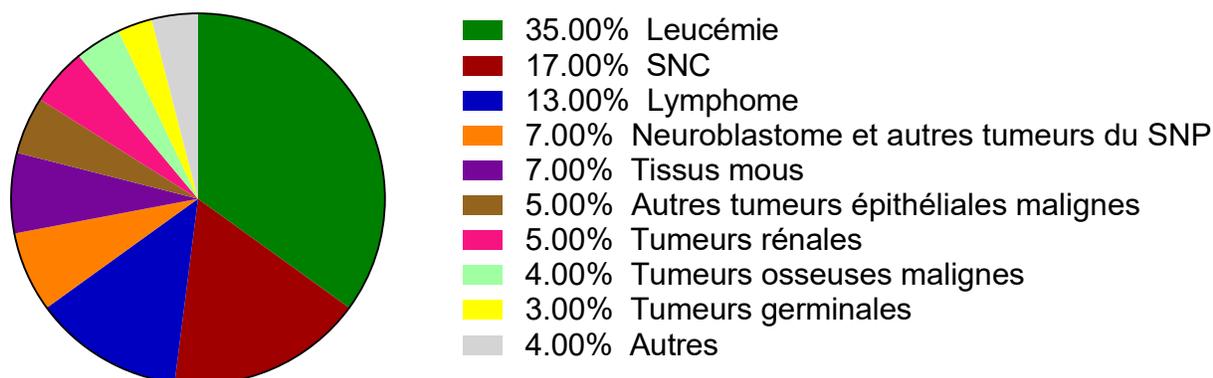


Figure 1. – **Distribution des nouveaux cas de cancer chez les enfants âgés de 0 à 14 ans au Canada entre 2013 et 2017.** Chiffres tirés de la publication annuelle de la Société canadienne du cancer, 2022.

Selon la société canadienne du cancer, 7% des cancers diagnostiqués entre 0 et 14 ans font partie de la catégorie du neuroblastome et des autres tumeurs du système nerveux sympathique. Les leucémies (35% des diagnostics) et les tumeurs du système nerveux central (17% des diagnostics) sont composées de plusieurs types de différentes tumeurs et ne représentent pas un seul type de cancer, renforçant l'importante incidence du neuroblastome pour ce groupe d'âge (3). La survie observée après 5 ans est de 81% mais cette dernière varie fortement selon le groupe de risque et diminue à 40-50% pour les patients du groupe de risque élevé (4).

L'incidence de la maladie est inversement proportionnelle avec l'âge des enfants, plus le patient développe le neuroblastome tardivement, plus la maladie sera à faible risque et les symptômes cliniques moindres. On estime que 50% des diagnostics se font entre l'âge de 1 à 4 ans (3, 4).

Aucune variation n'a été observé dans l'incidence de la maladie dans le monde (4). Cependant, une étude regroupant 3539 patients atteints de neuroblastome (blancs, 72 % ; noirs, 12 % ; hispaniques, 12 % ; asiatiques, 4 % ; et autochtones, < 1 %) démontre que les patients noirs et autochtones sont statistiquement plus susceptibles de présenter une maladie à haut risque que les blancs, mais que ces derniers sont plus résistants à la chimiothérapie (5). Finalement, les garçons sont diagnostiqués à un taux équivalent ou légèrement supérieur aux filles (4).

1.2 Aspect clinique et caractéristiques phénotypiques.

Les enfants atteints de cette maladie présentent généralement une masse para-spinale postérieure dans la glande surrénale ou le long de la chaîne sympathique dans la poitrine ou l'abdomen (6). Le neuroblastome appartient à un groupe connu sous le nom de tumeurs neuroblastiques périphériques, qui comprend les ganglio-neuroblastomes, les ganglioneuromes et les ganglio-neuroblastomes nodulaires (7).

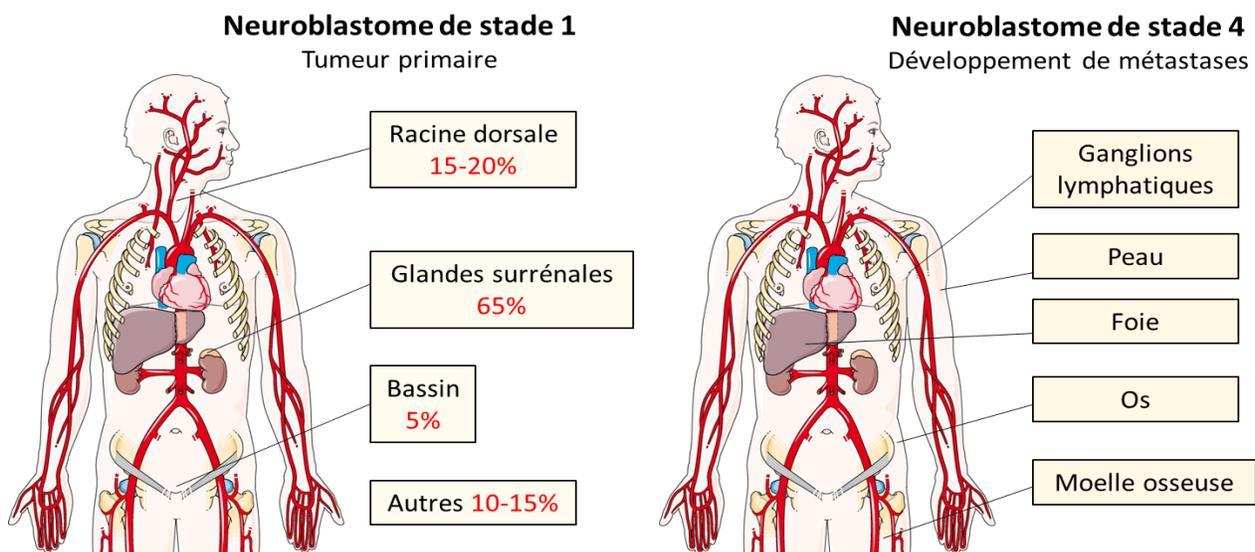


Figure 2. – **Sites de développement et de migration métastatique du neuroblastome.** Illustration adaptée de : American childhood cancer organization, 10 mai 2018. Éléments graphiques tirés de Servier Medical Art.

Les symptômes présentés chez les enfants atteints de neuroblastome varient en fonction du nombre et de l'emplacement de la tumeur et incluent des symptômes locaux d'une part: masse asymptomatique, compression de la moelle épinière, mal de dos, douleur osseuse ainsi que des lésions cutanées, et des symptômes systémiques d'autre part : perte de poids, fièvre, hypertension, diarrhée réfractaire, cytopénie, coagulation intravasculaire, syndrome de lyse tumorale et de la fatigue (2). Environ la moitié des patients présentent une maladie localisée (2) généralement dans la glande surrénale (la médullosurrénale) avec des métastases au niveau des os, de la peau, du système lymphatique, du foie ou de la moelle osseuse qui représentent les principaux sites de migration cellulaire par voie sanguine ou lymphatique dans les cas de tumeurs à haut risque (Figure 2).

Le neuroblastome est caractérisé par un comportement clinique hétérogène, allant de la régression spontanée ou la différenciation en un ganglioneurome bénin à une forte progression résistante aux thérapies multimodales agressives conduisant au décès du patient (8).

Le diagnostic du neuroblastome repose sur la confirmation histologique combinée au profilage chimique et aux caractérisations d'imagerie. La biopsie de la tumeur primitive pour les tumeurs localisées est principalement utilisée pour la confirmation histologique. Le neuroblastome appartient à la catégorie des tumeurs malignes à petites cellules rondes indifférenciées parfois appelées « bleues » car elles comprennent un grand noyau hyperchromatique et une faible surface cytoplasmique. Ces petites cellules peuvent être difficiles à diagnostiquer car elles sont peu différenciées et entrent dans cette catégorie « bleue » comprenant le rhabdomyosarcome, le sarcome Ewing, le lymphome non hodgkzien, le rétinoblastome, le néphroblastome et l'hépatoblastome. Dans le cas du neuroblastome, l'immunohistochimie est utilisée pour détecter des marqueurs biologiques tels que l'énolase, spécifique aux neurones, la protéine S-100, et la chromogranine (9, 10). L'évaluation comprend aussi la quantité de cellules de stroma Schwannien, le degré de nodularité, le degré de différenciation neuroblastique, l'index mitose-

caryorrhexis (MKI) et une note sur la présence de calcification (9). Le diagnostic par imagerie se fait par tomodensitométrie (TDM) et par résonance magnétique (IRM). Si le cancer est propagé, le médecin peut réaliser une TDM ou IRM de l'abdomen, du bassin et du thorax, une scintigraphie osseuse, une radiographie des os, un échantillon tissulaire et une procédure utilisant une substance radioactive appelée méta-iodobenzylguanidine (MIBG) qui aide à identifier la migration cellulaire (Merck Manuals, Renee Gresh, Juin 2021).

La plupart des enfants atteints de neuroblastome peuvent être guéris avec une chimiothérapie induisant une régression spontanée ou une différenciation suggérant que les tumeurs biologiquement favorables évoluent rarement en tumeurs biologiquement défavorables (11). La classification se fait ainsi selon le stade de la tumeur et de la présence de métastases (12).

1.3 Classification du neuroblastome

La classification internationale de la pathologie du neuroblastome (INPC), créée en 1999 et modifiée en 2003, est un système de classification significatif sur le plan pronostique (13). Selon l'INPC, les tumeurs de ce groupe sont classées dans 1 des 4 catégories différentes : neuroblastome (stroma schwannien pauvre) ; ganglioneuroblastome, mixte (riche en stroma schwannien); ganglioneurome (stroma de Schwannien à dominante); et le ganglioneuroblastome nodulaire (composite riche en stroma de Schwannien à dominante). Dans ce système, les tumeurs du neuroblastome et du ganglioneuroblastome, catégories nodulaires, ont respectivement 2 indicateurs histologiques : grade de différenciation neuroblastique et index mitose-caryorrhexis (MKI), avec des impacts pronostiques différents selon l'âge des patients au moment du diagnostic. Trois sous-types pronostiques se distinguent par grade : indifférencié (indiquant un mauvais pronostic dans n'importe quel groupe d'âge) ; peu différencié (indiquant un meilleur pronostic chez les patients <18 mois et un mauvais pronostic chez les patients ≥18 mois) ; et différencié (indiquant un meilleur pronostic chez les patients < 60 mois et un mauvais pronostic chez les patients ≥ 60 mois). Trois classes pronostiques se distinguent également par les activités mitotiques et caryorrhétiques des cellules neuroblastiques: faible MKI (L-MKI) (<100/5000 cellules, indiquant un meilleur pronostic chez les patients <60 mois et un mauvais pronostic chez

les patients ≥ 60 mois) ; MKI intermédiaire (I-MKI) (100–200/5000 cellules, indiquant un meilleur pronostic chez les patients < 18 mois et un mauvais pronostic chez les patients ≥ 18 mois) ; et MKI élevé (H-MKI) ($\geq 200/5000$ cellules ; indiquant un mauvais pronostic dans n'importe quel groupe d'âge) (14).

De plus, le système international de stadification du neuroblastome (INSS) divise la tumeur en fonction de la localisation de la tumeur primaire, de la présence de métastases et de leur emplacement (Figure 2).

Stade 1	Tumeur localisée au site primaire. Possibilité d'éradication complète par chirurgie. Tumeur non observable microscopiquement sur les nodules lymphatiques ipsilatéraux et controlatéraux.
Stade 2A	Tumeur localisée avec résection chirurgicale incomplète. Tumeur observable au niveau des nodules lymphatiques ipsilatéraux et controlatéraux. Non observable microscopiquement sur les nodules non adhérents.
Stade 2B	Tumeur unilatérale avec résection chirurgicale complète ou incomplète, avec tumeur observable sur les nodules non adhérent, ipsilatéraux et régionaux. Nodule controlatéral grossi mais tumeur non identifiable au microscope.
Stade 3	Tumeur non résécable infiltrant la ligne médiane, avec ou sans nodule régional impliqué. Tumeur unilatérale avec le nodule controlatéral et la tumeur infiltrant la ligne médiane comprend une atteinte bilatérale des ganglions lymphatiques.
Stade 4	Métastases à des nodules lymphatiques distants, à la peau, les os, la moelle osseuse, le foie et d'autres organes.
Stade 4S	Tumeur primaire localisée (Stade 1, 2A et 2B) avec métastases limitée à la peau, au foie et à la moelle chez les enfants de moins de 1 an. Niveaux élevés de ferritine sérique et du facteur inhibiteur E-rosette distinguant les phases 4 et 4S.

Tableau 1. – **Système de stadification du neuroblastome selon l'INSS.** Adaptée de (15).

1.4 Caractérisation moléculaire et cellulaire dans le neuroblastome

Les principales causes de la formation du neuroblastome sont les altérations oncogéniques que subissent les cellules sympathosurrénales dérivées de la crête neurale pendant l'embryogénèse (16).

La crête neurale donne naissance à différents types cellulaires par transition épithélio-mésenchymateuse. Celle-ci leur permet de se dissocier du tube neural et de se différencier en neurones périphériques, cellules de Schwann, mélanocytes, médullaire surrénale ou en squelette crâniofacial grâce à la pluripotence des cellules initiatrices de la crête neurale et cela en fonction de leur emplacement dans l'embryon (17, 18). La migration et la différenciation sont dirigées par plusieurs facteurs de transcription et par des protéines de signalisation tels que Sox, Fox, Snail, Pax et Wnt, BMP, RHO, SWI/SNF respectivement (Figure 3) (19).

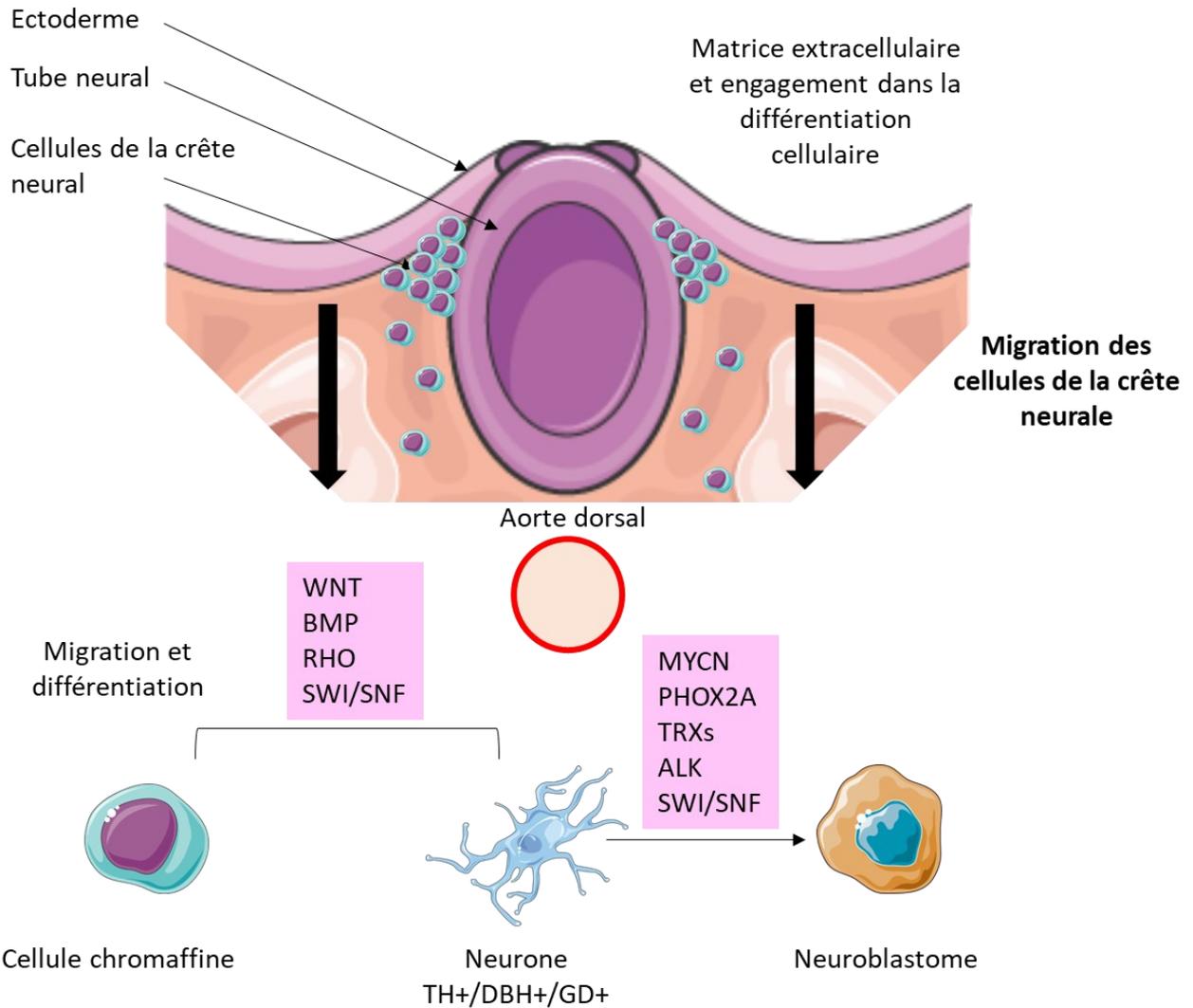


Figure 3. – **Développement du neuroblastome à partir de la crête neurale.** Adaptée de (20).

Éléments graphiques tirés de Servier Medical Art.

La dérégulation des facteurs impliqués dans la migration, la différenciation ainsi que l'apoptose peut induire des changements dans la spécification cellulaire donnant lieu à des lésions néoplasiques entraînant la formation du neuroblastome (20). Ces lésions agissent en influençant le génome en entraînant différentes mutations qui ont pour conséquence de favoriser des propriétés oncogéniques. D'autre part, d'une manière indépendante au génome, un changement de l'expression de gènes par différentes réactions tels que la méthylation et l'acétylation de la chromatine induit aussi un changement et des altérations pro tumorales (Figure 4).

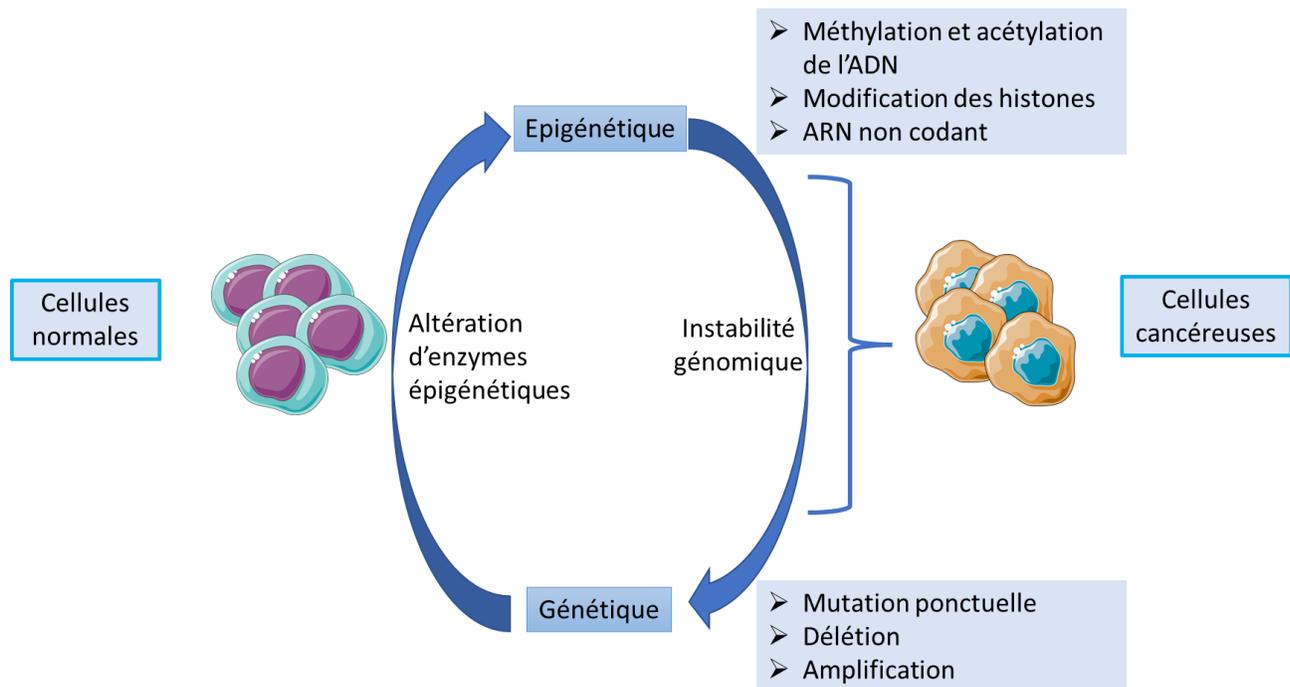


Figure 4. – **Représentation des altérations génétiques et épigénétiques associées à la carcinogénèse.** Adaptée de (21). Éléments graphiques tirés de Servier Medical Art.

Le génome et l'épigénome s'influencent mutuellement, car le génome fournit les informations de séquence primaire et code les régulateurs des états épigénétiques, tandis que l'épigénome contrôle l'accessibilité et l'interprétation du génome. Les changements dans l'un peuvent influencer l'autre, formant un partenariat dans la production de variations phénotypiques codées génétiquement ou épigénétiquement (12, 21).

Ces événements peuvent arriver à différents stades de la maturation de la crête neurale par des changements génétiques et épigénétiques de certains oncogènes comme *MYCN* qui est le principal facteur de risque et l'oncogène le plus puissant de cette tumeur induisant la prolifération et inhibant l'apoptose (20, 22, 23). La découverte de ces circuits régulateurs induisant la transformation oncogénique et le maintien du stade malin a ouvert plusieurs perspectives de thérapies ciblant les déterminants génétiques et épigénétiques du neuroblastome (22).

1.5 Altérations génétiques

Le neuroblastome présente une hétérogénéité génétique remarquable de part la dérégulation de l'expression de plusieurs oncogènes et facteurs de transcription et d'autre part de plusieurs altérations chromosomiques qui promeuvent la progression tumorale (22). Plusieurs analyses d'expressions génétiques par séquençage à haut débit ont révélé la variation génétique du neuroblastome. En effet, en 2013, des échantillons d'ADN génomique de 240 neuroblastomes à haut risque ont été séquencés et il a été constaté que les mutations somatiques récurrentes dans les gènes tels que *ALK* (9,2%), *PTPN11* (2,9%) *ATRX* (2,5%) étaient rares (moins de 25%) tandis que les altérations chromosomiques et l'amplification de *MYCN* (32,1%), le gain de 17q (80,4%) et la perte de 11q (47,5%) étaient fréquemment observées (12).

1.5.1 Amplification des principaux oncogènes

1.5.1.1 *MYCN*

Le rôle de *MYCN* (Neuroblastoma-Derived V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral) dans le développement du neuroblastome a été démontré avec le modèle murin surexprimant le transgène *MYCN* lors du développement de la crête neurale sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase (TH). Ces souris TH-*MYCN* développent rapidement la tumeur et servent de modèles pour comprendre les mécanismes et tester des nouvelles thérapies (24). Chez les enfants, la survie est de 10% dans le cas où *MYCN* est amplifié et sert donc de marqueur à haut risque de cette tumeur (25).

MYCN est fortement exprimé dans la crête neurale post-migratoire précoce et régule la migration ventrale et la croissance des cellules dans la crête neurale au cours du développement sympatho-surrénalien murin normal. L'expression de *MYCN* diminue progressivement dans la différenciation des neurones sympathiques, ce qui suggère que la maturation sympatho-surrénalienne est indépendante de l'expression de *MYCN* (26).

MYCN contient une région basique C-terminale qui peut se lier à l'ADN, et un domaine hélice-boucle-hélice (HLH)-leucine zipper (Zip), qui est responsable de l'interaction physique avec une autre protéine HLH-Zip, MAX. Cette structure est conservée parmi tous les membres de la famille

de gènes *MYC*. Les dimères résultants peuvent se lier à la séquence d'ADN CACGTG (aussi appelée E-box) dans la région promotrice pour contribuer à l'expression des gènes impliqués dans la prolifération et la croissance cellulaire, dans la réplication de l'ADN, dans l'augmentation de la biogenèse des protéines, dans les changements globaux du métabolisme cellulaire, dans l'activation de l'angiogenèse et dans la limitation des réponses immunitaires (27, 28). Ainsi, *MYCN* permet l'amplification de plusieurs autres gènes oncogéniques (29).

Une étude menée sur 89 tumeurs primaires de neuroblastome non traitées démontre une association significative entre l'amplification de *MYCN* avec la progression rapide de la tumeur montrant l'importance clinique de cet oncogène (30). De plus, dans les cas de stades avancés du neuroblastome (3 et 4) avec une amplification de *MYCN*, une survie de 22% à 3 ans est observée (31). La prévalence de l'amplification de *MYCN* chez les patients atteints de neuroblastome est de 20 % à 30 % et la survie globale de ces patients reste inférieure à 50 % (26).

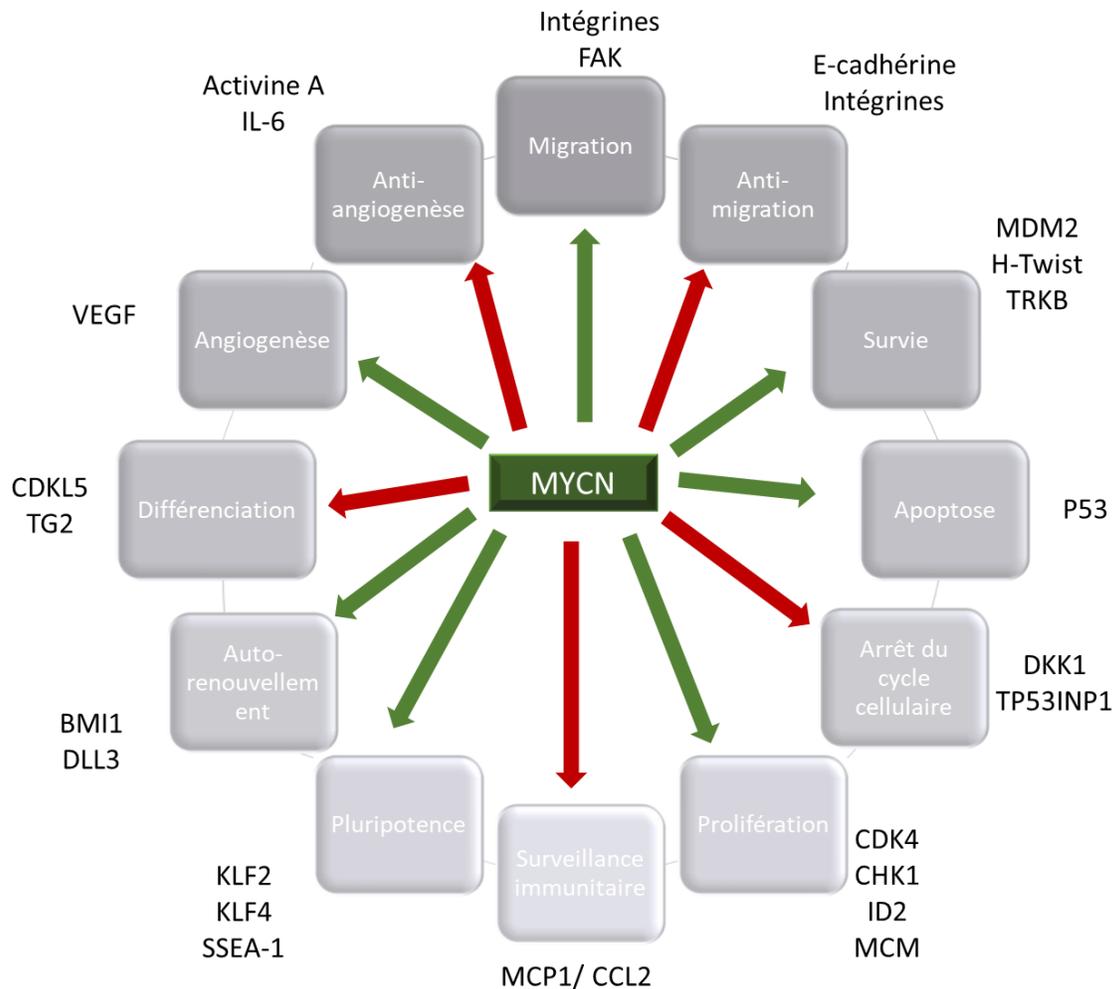


Figure 5. – **Rôle de MYCN dans le maintien et le développement du neuroblastome.** Figure adaptée de (23).

MYCN peut activer la transcription de gènes impliqués dans la métastase, la survie, la prolifération, la pluripotence, l'auto-renouvellement et l'angiogenèse. De plus, MYCN peut inhiber l'expression des gènes qui favorisent la différenciation, l'arrêt du cycle cellulaire, la surveillance immunitaire et les gènes diminuant les métastases et l'angiogenèse (Figure 5) (23). In vitro, sur des cellules de neuroblastome, il a été montré que l'inhibition de la transcription de MYCN par ARNi induit la différenciation cellulaire, l'inhibition de la croissance cellulaire et l'induction de l'apoptose (32).

1.5.1.2 ALK

Le gène de la kinase du lymphome anaplasique *ALK* situé sur le chromosome 2p23 code pour un récepteur tyrosine kinase qui est normalement exprimé à des niveaux élevés dans le système nerveux et a été identifié à l'origine comme une protéine de fusion impliquée dans diverses voies de signalisation cellulaire, telles que Ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt et Janus protein tyrosine kinase (JAK)/STAT dans le lymphome non hodgkinien (26). La protéine est donc impliquée dans la transduction du signal et agit tôt dans le développement néonatal du système nerveux pour aider à réguler la prolifération et a un rôle dans la différenciation des cellules nerveuses. Son rôle dans la maladie est plus connu que sa fonction physiologique normale (33, 34).

La moitié des cas familiaux de neuroblastome (représentant 1-2% des cas) sont associés à des mutations germinales : gain de fonction de *ALK* (35, 36).

ALK de type sauvage (pleine longueur) est une protéine avec une région extracellulaire contenant un domaine MAM (méprine, protéine A-5 et protéine réceptrice-tyrosine phosphatase mu), une lipoprotéine de basse densité de classe A (LDL_A), et des domaines riches en glycine, en plus d'une région transmembranaire et d'une région intracellulaire contenant le domaine kinase. *ALK* subit une N-glycosylation pour produire une glycoprotéine à chaîne unique lorsqu'elle est tronquée par clivage extracellulaire (35, 37). Dans le neuroblastome, trois mutations ponctuelles sont principalement responsables de l'activation de l'oncogène *ALK* : sur la boucle P, l'hélice C ainsi que sur la boucle activatrice. Elles représentent 85% des mutations dans le neuroblastome dépendant des mutations de *ALK* (38). Ces dernières sont qualifiées de "points chauds" en position R1275, F1174 et F1245 (39). Les mutations *ALK* sont corrélées à l'amplification de *MYCN* et des études sur des modèles de souris et de poisson zèbre ont démontré l'activité coopérative de ces deux oncogènes dans le développement du neuroblastome. De plus, il a été démontré que les formes de type sauvage et mutantes d'*ALK* induisent la transcription de *MYC* dans les lignées cellulaires de neuroblastome; cela peut expliquer le mauvais pronostic des patients porteurs à la fois de mutations *ALK* et d'amplification de *MYCN* (35, 40, 41).

Pour identifier de nouvelles mutations conductrices du neuroblastome, des efforts intenses se sont concentrés sur des études d'association à l'échelle du génome (GWAS), ainsi que sur des études de séquençage de l'exome entier et du génome entier d'échantillons de tumeurs (23).

1.5.2 Aberrations chromosomiques

1.5.2.1 Gain du chromosome 17q

Les anomalies du chromosome 17 ont été impliquées pour la première fois dans le neuroblastome au début des années 1980. Les analyses cytogénétiques en bande G de 98 lignées cellulaires et de 99 tumeurs primaires ont enregistré des gains du segment chromosomique 17q21 dans les caryotypes tumoraux (42). Le développement des techniques FISH au milieu des années 1990 a mis en avant l'aberration du chromosome 17q au premier plan de la génétique du neuroblastome, initialement, par la découverte que pratiquement toutes les lignées cellulaires de neuroblastome incluent des translocations impliquant ce bras chromosomique (à 80,4%) (43, 44).

Le gain du chromosome 17 entier est plus susceptible d'être observé dans les tumeurs présentant des caractéristiques cliniques et génétiques favorables tandis qu'un gain partiel déséquilibré de 17q est significativement associé à des indicateurs de haut grade dans le neuroblastome. Ce dernier est plus fréquent dans les maladies à un stade avancé, dans les tumeurs chez les enfants âgés de plus d'un an et dans les tumeurs présentant une perte du chromosome 1p, une amplification de *MYCN* et une diploïdie ou une tétraploïdie (42).

1.5.2.2 Perte du chromosome 11q

La perte du chromosome 11q constitue la région la plus fréquemment supprimée du génome du neuroblastome (47,5%) (12). Une région consensus de délétion de 2,1 cM (centimorgan) a été identifiée dans la bande 11q23.3. La perte du chromosome 11q est significativement associée à des paramètres cliniques défavorables (âge > 1 an, maladie de stade 4, histologie défavorable), mais inversement corrélée à l'amplification de *MYCN* (42). De rares cas d'anomalies de cette

région sont observées chez les enfants qui développent la maladie, notamment des délétions, des inversions et des translocations 11q équilibrées (42).

1.6 Altérations épigénétiques

L'épigénome et les mécanismes de régulation épigénétique régissent les fonctions cellulaires normales, le développement et sont impliqués dans l'apparition du cancer. Les modifications épigénétiques permettent, à partir d'une même séquence d'ADN primaire de moduler l'expression génique via le changement d'état de la chromatine. Ces modifications réversibles permettent le passage rapide entre un état répressif à la transcription (appelé hétérochromatine) et un état permissif (euchromatine) sans en altérer la séquence. Il est estimé qu'environ 50% de toutes les mutations dans les cellules tumorales affectent les protéines contrôlant l'état de la chromatine (Figure 6) (45, 46).

D'un point de vue épigénétique, la transcription est régulée par 4 grands groupes de mécanismes : les modifications post traductionnelles des histones, la méthylation de l'ADN, le remodelage de la chromatine, et le recrutement de facteurs de transcription. Enfin, une grande majorité de ces états transcriptionnels ne sont pas uniquement induites par l'action de protéines régulatrices mais reposent également sur les interactions protéine/ARN non codant (45, 47).

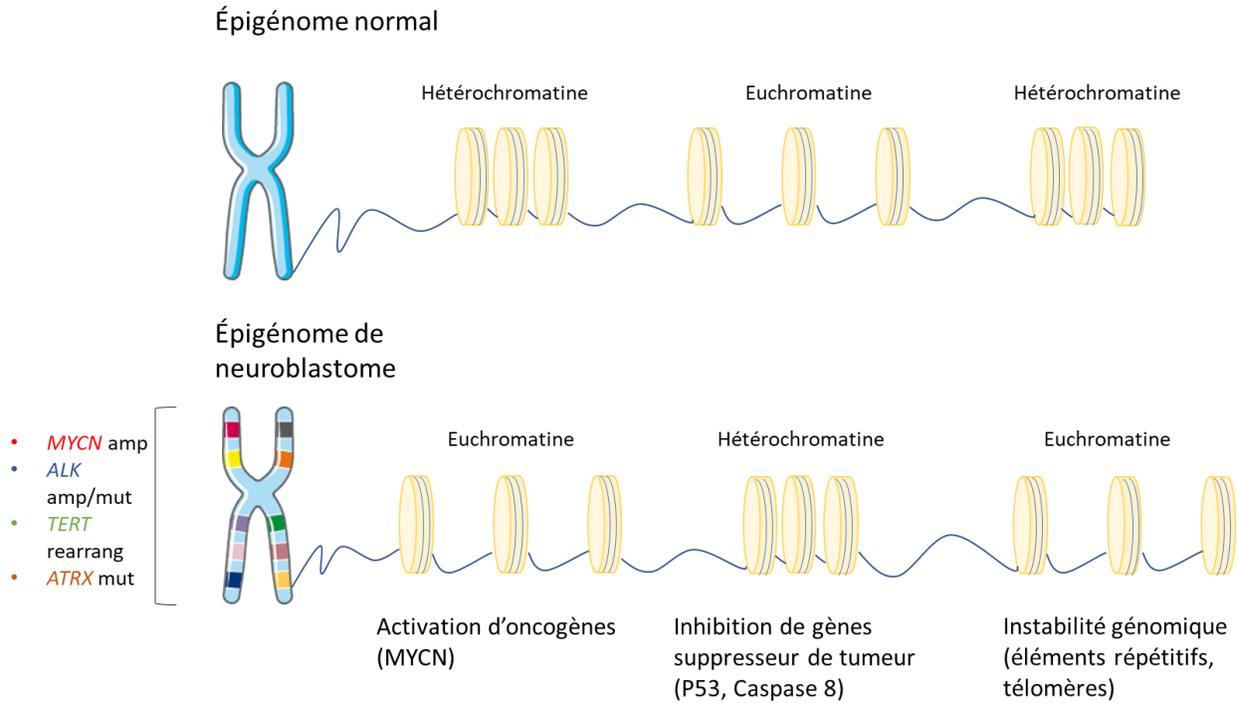


Figure 6. – **Modifications de la structure de la chromatine dans les cellules de neuroblastome.**

Adaptée de (48). Éléments graphiques tirés de Servier Medical Art.

Les différentes caractéristiques des états épigénétiques viennent conjointement agir dans le contexte du neuroblastome en jouant sur l'expression des oncogènes (*MYCN*, *ALK*) et sur les gènes suppresseurs de tumeur. L'épigénome des cellules de neuroblastome est caractérisé par une configuration anormale globale du nucléosome ouvert (euchromatine), ou fermé (hétérochromatine) (Figure 6) (48).

1.6.1 Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN en cinquième position de la cytosine (5mC) dans les dinucléotides CpG est un mécanisme épigénétique majeur impliqué dans la programmation et la reprogrammation du génome, et la détermination du destin cellulaire au cours du développement. Ainsi, les perturbations de la méthylation de l'ADN sont associées à différentes pathologies, tels que le cancer (49, 50). Les modifications de l'épigénome impliquées dans le développement du cancer sont généralement associées à une perte de méthylation globale de l'ADN et à un gain de

méthylation de l'ADN au niveau de promoteurs de gènes spécifiques. Les conséquences de la perte de méthylation globale comprennent l'instabilité chromosomique, la perte d'empreinte et l'activation d'éléments transposables, entraînant ainsi des perturbations du génome (48, 50). La méthylation de l'ADN est réalisée par les ADN méthyltransférases (DNMT). Au cours de la division cellulaire, la méthylation de l'ADN est établie par DNMT1 ou l'ADN méthyltransférase de maintenance, tandis que DNMT3A et 3B sont responsables de la méthylation *de novo* (48, 51).

Dans le cas du neuroblastome, une étude spécifique à l'hyperméthylation spécifique aux gènes démontre une perte d'expression de la caspase 8 due à des hauts niveaux de méthylation de l'ADN au niveau du gène de la caspase 8. De plus, avec l'amplification de *MYCN* la croissance tumorale et l'inhibition de l'apoptose est induite (Figure 7) (48, 52). En effet, des niveaux réduits de protéine caspase-8 ont été observés dans une tumeur maligne de stade IV NB par rapport à un ganglioneurome bénin (53). La caspase 8 est une protéase à cystéine dite initiatrice. Sa fonction est d'activer les caspases effectrices, telles que la caspase 3 et la caspase 7, qui mèneront la cellule à son autodestruction par le processus d'apoptose. Son expression est diminuée, voire absente dans les tumeurs de neuroblastomes de haut stade par rapport à celles des stades inférieurs (Figure 7) (53).

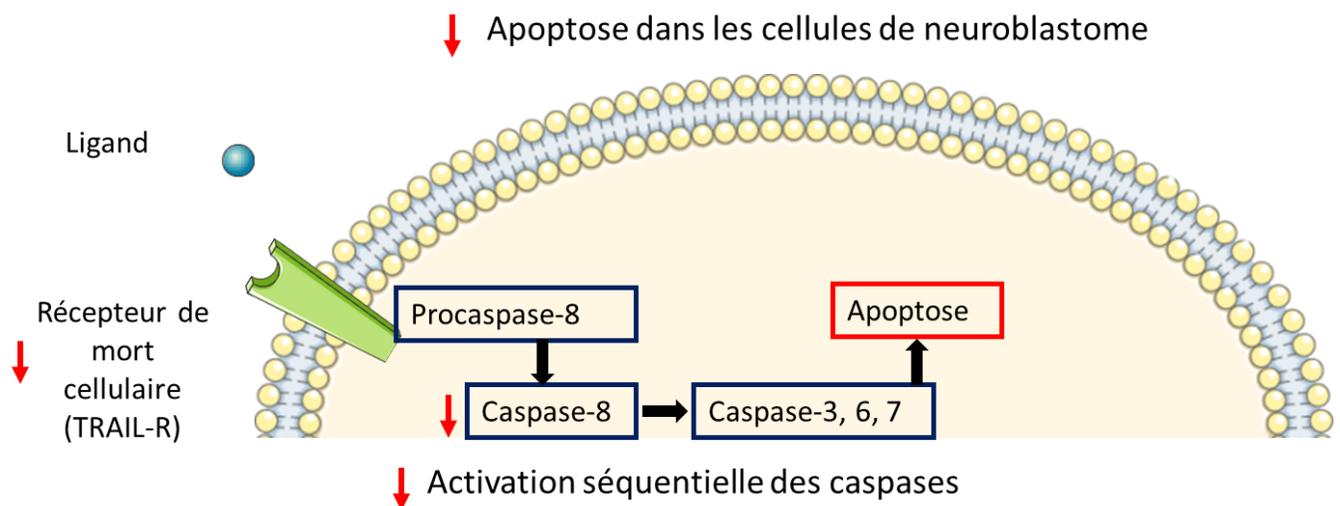


Figure 7. – **Mécanisme d'action de la caspase 8 via le récepteur de mort cellulaire.** Adaptée de (53). Éléments graphiques tirés de Servier Medical Art.

Une classification des niveaux de méthylation de l'ADN dans plusieurs cancers a été mis en place et est associée à l'augmentation du facteur de risque dans le neuroblastome (54-56). En effet, un patient avec une CIMP (CpG island methylator phenotype) présente un taux de survie d'environ 50% (57).

1.6.2 Modifications post-traductionnelles des histones

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome, composée de 147 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère de protéines histones. Cet octamère comprend 4 histones : H2A, H2B, H3 et H4 présentes en doublet. L'hypothèse du « code des histones » suggère que différentes combinaisons de modifications d'histones peuvent réguler la structure de la chromatine et ainsi le statut transcriptionnel (58). En effet, les histones sont soumises à diverses modifications post-traductionnelles (PTM), y compris l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitination, et ces PTM sont régulées par des enzymes spécialisées modifiant les histones (59, 60). La modulation des chaînes N-terminales des histones H3 et H4 par plusieurs modifications post-traductionnelles (PTM) se traduit par une accessibilité et une activité différentielle des régulateurs de transcription sur des séquences d'ADN spécifiques. L'acétylation de la lysine (K) sur les H3 et H4 est l'une des PTM des histones les plus importantes en relation avec l'expression des gènes et l'euchromatine (61). D'autre part, les schémas de méthylation des histones et leurs effets sur la transcription sont plus complexes que l'acétylation, en effet, certains sites de méthylation sont associés à la chromatine transcriptionnellement permissive (euchromatine) et certains sont répressifs, favorisant la formation d'hétérochromatine : les états H3K27me3 et H3K9me sont associés à l'inhibition des gènes, alors que les états H3K4me3 et H3K36me3 sont des modifications transcriptionnellement permissives (58).

1.6.2.1 L'acétylation des histones

L'acétylation et la désacétylation des histones exercent un équilibre qui contrôle la transcription des gènes et est régulé par l'action opposée de deux familles d'enzymes, les histones acétyltransférases (HAT) tels que la protéine de liaison CREB (CBP) et p300, MYST et GNAT et les histones désacétylases (HDAC) (59). L'acétylation des histones est associée à la transcription active, la désacétylation des histones quant à elle est associée à la répression transcriptionnelle.

De plus, il a été démontré que certains HDAC participent à une boucle de rétroaction positive avec *MYCN* (62). Il existe 4 classes d'enzymes d'histone désacétylase (HDAC), avec des membres capables de désacétylation des histones et/ou d'autres cibles protéiques. Ces protéines régulatrices sont elles-mêmes soumises à une régulation par acétylation, phosphorylation et sumoylation (58). Les HDAC de classe I (HDAC1, -2, -3, et -8) se localisent dans le noyau et peuvent désacétyler les quatre histones centrales, régulant l'accessibilité du génome pour la transcription. Chaque enzyme HDAC de classe I peut désacétyler plusieurs résidus de lysine sur les histones, et la plupart de ces lysines peuvent être désacétylés par plus d'une HDAC de classe I (63). Ces dernières présentent l'activité d'histone désacétylase la plus forte. Parmi les HDAC de classe I, HDAC8 est la moins exprimée dans les tissus sains. De plus, il a été démontré que la délétion d'HDAC8 provoquait des défauts crâniofaciaux entraînant une létalité prénatale (64). HDAC8 joue un rôle clé dans le développement neuronal, et est aussi exprimée par les cellules présentant une différenciation musculaire lisse, essentielle à la contractilité de ces cellules (61, 65). Une étude utilisant l'immunohistochimie démontre que dans les tissus humains normaux, HDAC8 est exclusivement exprimée par des cellules présentant une différenciation musculaire lisse, y compris les cellules musculaires lisses viscérales et vasculaires, les cellules myoépithéliales et les myofibroblastes, et est principalement détectée dans leur cytosol (66).

D'autre part, le neuroblastome est la première entité tumorale dans laquelle l'expression de tous les membres de la famille des HDAC classiques a été étudiée dans une large cohorte d'échantillons de tumeurs (67). Seule l'expression de HDAC8 était significativement corrélée aux stades avancés et aux métastases et diminue dans le neuroblastome de stade 4S (lequel est associé à une régression spontanée). Une expression élevée de HDAC8 était associée à de mauvais marqueurs pronostiques et à une faible survie globale. L'inactivation *in vitro* de *HDAC8* a entraîné l'inhibition de la prolifération, la réduction de la croissance clonogénique, l'arrêt du cycle cellulaire et la différenciation dans les cellules de neuroblastome *in vitro* (67, 68).

1.6.2.2 La méthylation des histones : le complexe « polycomb repressive complex 2 » (PRC2)

La méthylation des histones joue un rôle dans de nombreux niveaux de régulation transcriptionnelle, dans l'architecture de la chromatine, la régulation de locus spécifiques ainsi

que le recrutement de facteurs de transcription spécifiques aux cellules et l'interaction avec les facteurs d'initiation et d'élongation (69). La méthylation des histones se retrouve sur les résidus arginine (R) et lysine (K). Le groupement -méthyl est déposé par les histones méthyltransférases (HMT) et il est retiré par les histones déméthylases (HDM). Contrairement à l'acétylation, la méthylation des histones ne modifie pas la charge de la protéine histone (59). Les sites de méthylation des histones les plus étudiés comprennent l'histone H3 lysine 4 (H3K4), H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 et H4K20. Les sites de méthylation de l'arginine comprennent H3R2, H3R8, H3R17, H3R26 et H4R3 (69).

EZH2 est un HMT membre du complexe répressif polycomb 2 (PRC2) qui est responsable de l'établissement de la tri-méthylation de l'histone H3K27, un marqueur de la chromatine réprimée (48, 70). Dans les neuroblastomes *MYCN* amplifiés, le promoteur de *EZH2* est occupé par *MYCN*, à la fois *in vitro* et *in vivo*, entraînant ainsi son expression (48). Le complexe PRC2 est essentiel au développement embryonnaire et affecte la structure de la chromatine, l'expression des gènes et l'identité cellulaire (71).

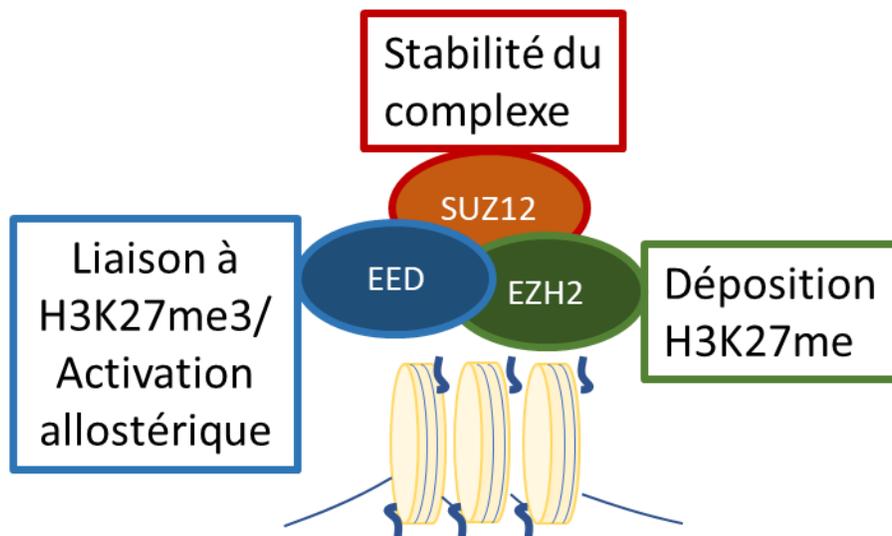


Figure 8. – **Composition du complexe PRC2 et liaison à l'histone H3K27me3.** Adaptée de (71).

PRC2 comprend les sous-unités centrales EZH1/2, EED, SUZ12 et RBBP4/7 (Figure 8) (72). EZH2 est la principale sous-unité catalytique pour méthyler H3K27. À noter qu'elle est auto-inhibée lorsque seule et nécessite la présence de EED et SUZ12 pour être active (73). SUZ12 sert de facteur

de stabilisation pour PRC2 via son domaine VEFS, tandis que le reste de SUZ12 (delta-VEFS) peut être recruté pour cibler des loci indépendamment des autres sous-unités centrales de PRC2. Il a été montré que ce complexe a une forte tendance à être présent sur les promoteurs des îlots CpG de gènes faiblement transcrits et inactifs. Bien qu'il ait été démontré que la boucle de rétroaction via la liaison de l'EED à H3K27me3 aide à maintenir le complexe sur ces sites cibles riches en CpG, la présence de H3K27me3 n'est pas nécessaire pour le recrutement de PRC2 dans ces régions (Figure 8) (71, 74).

Dans le neuroblastome, une étude établit le lien entre l'augmentation d'activité de H3K27me3 au niveau des gènes cibles du PRC2 et une croissance tumorale accentuée et une diminution du taux de survie. De plus, l'expression de *EZH2* est vitale pour la croissance et maintient l'identité des cellules de neuroblastome *in vitro*, en effet, ce dernier inhibe plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs qui contrôlent la différenciation dans le neuroblastome tels que *CLU*, *RUNX3* et *NGFR* (75). Il a aussi été rapporté que dans le neuroblastome, PRC2 interagit physiquement avec les ADN méthyltransférases, pour réguler directement la méthylation de l'ADN ainsi qu'avec *MYCN* (76-78). *EZH2* stabilise les protéines de la famille MYC et maintient l'amplification transcriptionnelle dépendante de *MYCN* indépendamment de son activité méthyltransférase (79). Ainsi, le contrôle transcriptionnel médié par le complexe PRC2 pendant l'embryogénèse est critique dans le développement du neuroblastome (78).

1.6.3 Circuit de régulation de la transcription

Les programmes d'expression génique à l'origine de l'identité cellulaire sont régulés par des facteurs de transcription qui s'autorégulent et qui collaborent avec *MYCN*, formant des circuits de régulation centraux (CRC). Ces derniers coordonnent l'expression des oncogènes (Figure 9). L'acétylation et la méthylation de l'histone H3K27 sont redistribuées aux régions super-amplificatrices du génome entraînant l'expression des différents facteurs de transcription (80). Ces régions super-amplificatrices sont liées à des protéines dont les protéines BET (bromodomain and extraterminal) comme BRD4 (bromodomain-containing protein) qui influencent la structure et la compaction de la chromatine (81-83). Ces événements déclenchent l'accessibilité de l'ARN polymérase et l'imposition d'une expression génique spécifique aux lignées programmant ainsi l'identité cellulaire par le contrôle de la multipotence et la différenciation cellulaire (80). Ainsi,

dans le développement des cellules de la crête neurale embryonnaire, cette architecture dynamique de facteurs de transcription et de réseaux de régulation donne lieu à diverses lignées cellulaires. Dans les cancers, les CRC déterminent sont soumis à différentes altérations sur les facteurs de transcription clés induisant une perturbation des CRC et donnant lieu à l'amplification de plusieurs oncogènes (Figure 9) (82, 83).

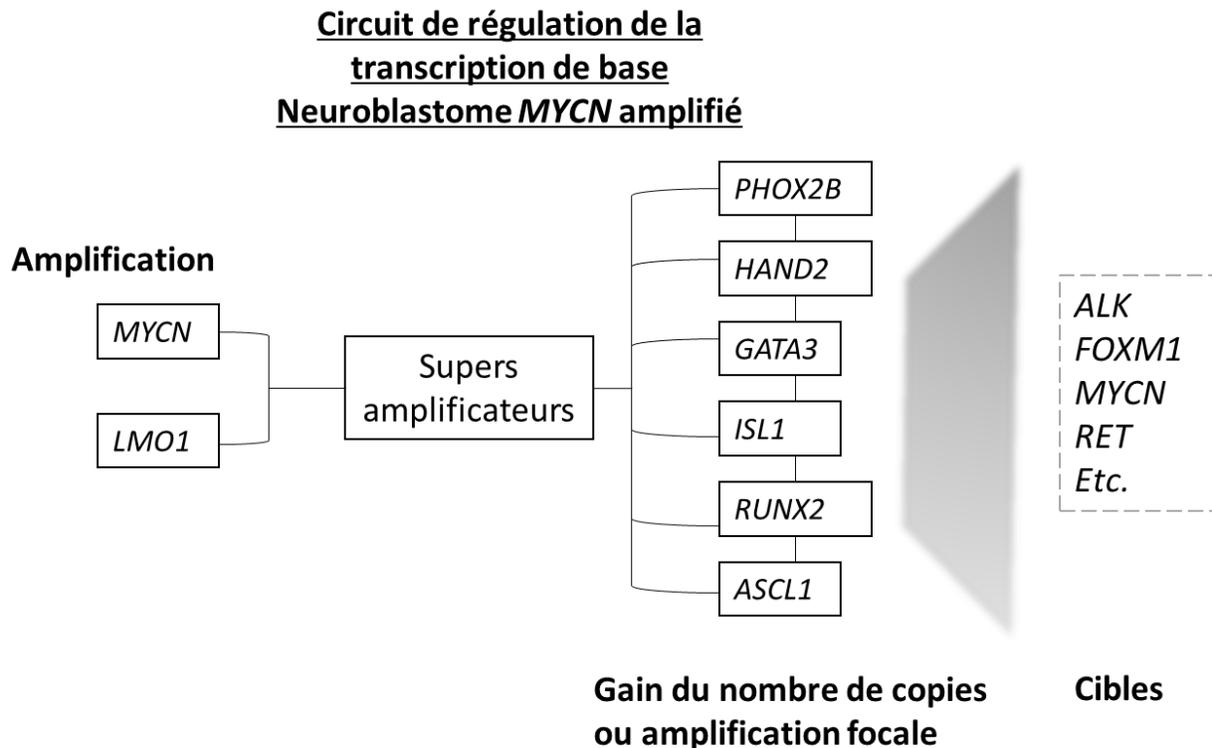


Figure 9. – **Modélisation du circuit de régulation de base dans le neuroblastome.** Adaptée de (84).

Dans le neuroblastome, *PHOX2B*, *GATA3*, *HAND2*, *RUNX1*, *RUNX2*, *RUNX3*, *TBX2*, *ISL1* et *ASCL1* sont des facteurs de transcription dont les effets sont amplifiés par *MYCN* (Figure 9) (85). Une étude sur 25 lignées cellulaires différentes de neuroblastome montre que plus de 90% des régions super-amplificateurs du neuroblastome sont occupées par *PHOX2B*, *HAND2* et *GATA3* qui permettent de lier les régions régulatrices actives afin d'activer la transcription d'oncogènes et définissent l'identité noradrénergique des cellules de neuroblastome (85). Finalement, l'implication épigénétique de ces facteurs de transcription dans les réseaux de régulation de gènes, les voies moléculaires et les cascades de signalisation conduit à association à une valeur

pronostique dans la survie des patients et peuvent être des cibles thérapeutiques pour plusieurs cancers (86).

Plusieurs essais thérapeutiques visant le circuit de régulation de la transcription adrénérgique dans le neuroblastome ont été effectués, y compris le traitement combiné de l'inhibiteur de CDK7 (THZ1) avec un inhibiteur de la protéine BET (JQ1) ou un inhibiteur de HDAC (Panobinostat) (87). La combinaison de THZ1 et JQ1 a démontré des effets répressifs synergiques sur la viabilité cellulaire et l'expression des gènes du CRC. Étant donné que la plasticité des CRC dans les neuroblastomes a été observée au cours du traitement chimiothérapeutique, l'incorporation d'agents perturbateurs du CRC dans le schéma thérapeutique actuel pourrait apporter un bénéfice supplémentaire aux patients atteints de neuroblastome (84, 85).

2 – Le microenvironnement tumoral

2.1 Composition tumorale

Dans le neuroblastome, et les cancers en général, les altérations génétiques et épigénétiques des cellules cancéreuses ne sont pas les seules à entrer en compte dans le développement tumoral. En effet, les cellules cancéreuses sont en interaction avec plusieurs autres types de cellules formant la masse tumorale qui impacte la progression et les propriétés tumorales. On parle de microenvironnement tumoral (TME) (6, 88). Les cellules immunitaires innées et adaptatives telles que les macrophages associés aux tumeurs (TAM), les cellules dendritiques (DC), les cellules tueuses naturelles (NK) représentant les cellules immunitaires innées et les cellules NKT (sous-type lymphocytaire caractérisé par l'expression d'un TCR semi-invariant ; il représente < 1 % des lymphocytes T) et les lymphocytes T et B représentant les cellules immunitaires adaptatives ont fait l'objet de beaucoup d'attention récemment, avec de nouveaux développements en immunothérapie. Cependant, les cellules non immunitaires telles que les cellules endothéliales (CE), les péricytes, les cellules de Schwann (SC) et, plus récemment décrites, les fibroblastes associés au cancer (CAF) contribuent également au microenvironnement dans les tumeurs du neuroblastome (88). Ainsi, ces deux types cellulaires (immunitaires et non-immunitaires) seront décrits. Par la suite, dans le cadre de notre projet, une emphase particulière sera faite sur les cellules NK et sur leur rôle dans l'immunosurveillance du neuroblastome.

2.1.1 Cellules non-immunitaires

Parmi les cellules non-immunitaires importantes dans le neuroblastome, nous retrouvons les cellules de Schwann (SC), dérivées de la crête neurale et qui entourent les axones des nerfs périphériques. La présence de celles-ci dans les tumeurs NB définit un groupe de tumeurs "riches en stroma" associées à une évolution favorable de la maladie (14). Des preuves génétiques indiquent que les cellules de Schwann représentent une population réactive de cellules normales, c'est-à-dire de cellules de neuroblastome différenciées (88). Les tumeurs *MYCN-A* et *MYCN-NA* à haut risque sont pauvres en SC et les tumeurs riches en SC présentent rarement une amplification

de *MYCN* (Figure 10) (89). Les SC contribuent à un TME qui inhibe la croissance tumorale NB en étant une source de facteurs anti-angiogéniques (90). L'angiogenèse est le processus par lequel certaines tumeurs développent de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux hôtes existants. Une fois que l'angiogenèse tumorale est établie, elle permet une croissance tumorale et métastatique supplémentaire au moyen des nouveaux vaisseaux sanguins (91, 92).

Les principaux facteurs stimulant l'angiogenèse sont probablement le facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF) et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Ce dernier est exprimé dans les cellules de neuroblastome et ses récepteurs correspondants Flt-1 et Flk-1/KDR sont exprimés dans les cellules endothéliales. L'exposition des cellules de neuroblastome à l'hypoxie induit une augmentation marquée du VEGF favorisant la formation de nouveaux capillaires dans la tumeur (91).

Les tumeurs contiennent aussi une population de cellules de soutien appelées fibroblastes. Contrairement aux fibroblastes normaux, les fibroblastes associés au cancer (CAFs) prolifèrent rapidement, sécrètent de la matrice extracellulaire comme le collagène ou la fibronectine. La présence de CAFs est associée à des tumeurs plus invasives, une augmentation de l'angiogenèse, une diminution de la présence des cellules de Schwann et favorise le phénotype mésenchymateux des cellules cancéreuses (c'est-à-dire un phénotype migratoire qui va conférer aux cellules la capacité de former des métastases) (88, 93, 94). Ainsi, une corrélation avec la baisse de la survie des patients est observée en présence de CAFs (88).

2.1.2 Cellules immunitaires

La famille des cellules immunitaires est composée des macrophages associés aux tumeurs (TAM), des lymphocytes B et T, des cellules NK et des cellules NKT (Figure 10). Les tumeurs *MYCN* amplifiées sont plus pauvres en cellules T exprimant les récepteurs CD4 et CD8, en cellules B, en cellules NK et en cellules NKT alors que les tumeurs *MYCN* non-amplifiées sont moins vascularisées mais sont plus infiltrées de cellules immunitaires innées et adaptatives. En d'autre terme, une tumeur à haut risque est plus pauvre en cellules immunitaires qui ont pour rôle de détruire les cellules de neuroblastome (88). De façon générale, on parle d'une tumeur froide pour définir une tumeur où le système immunitaire est faiblement présent. À l'inverse, une tumeur

chaude est définie par la présence d'un système immunitaire plus développé au sein de celle-ci (88).

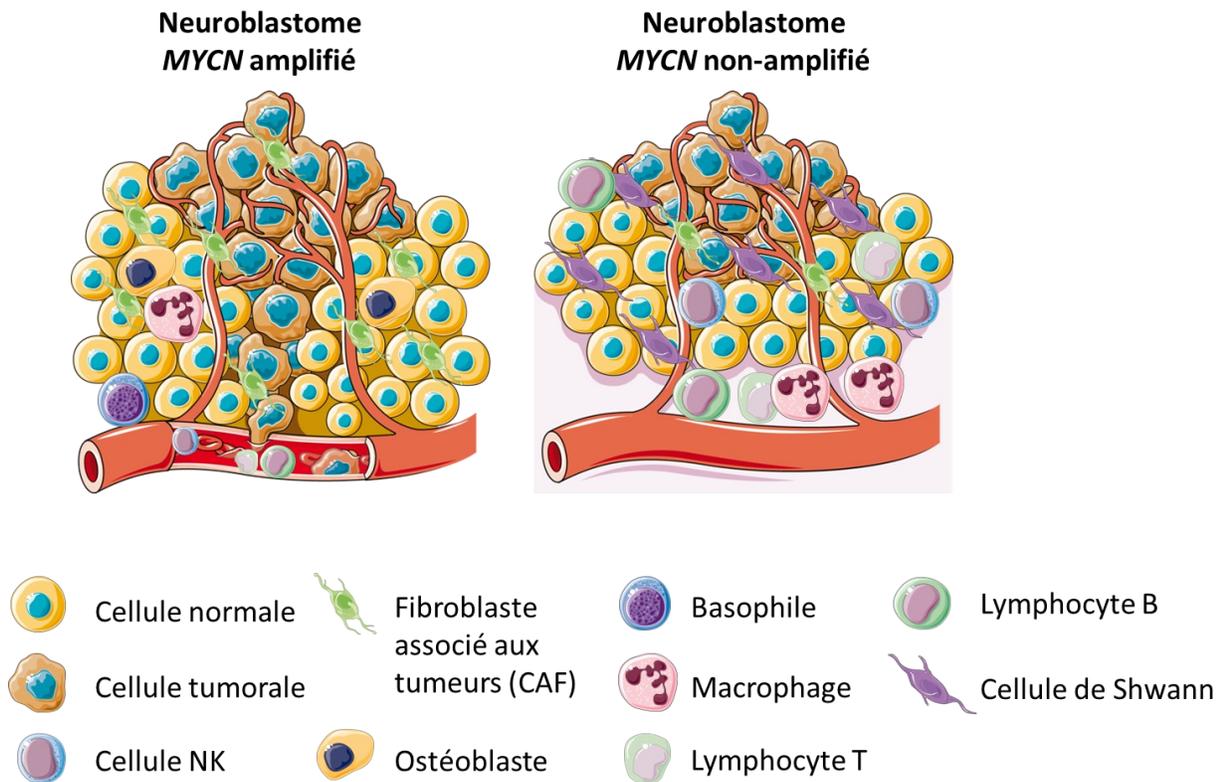


Figure 10. – **Composition tumorale d'une tumeur de neuroblastome en fonction de l'amplification de *MYCN*.** Adaptée de (88). Éléments graphiques tirés de Servier Medical Art.

Cette faible immunogénicité dans les tumeurs *MYCN-A*, c'est-à-dire la capacité d'un antigène à induire une réponse immunitaire est expliquée par deux conditions : d'une part, par l'absence d'infiltration lymphocytaire au sein de la masse tumorale et d'autre part par la présence d'une activité antitumorale faible des quelques lymphocytes infiltrant la tumeur appelés TIL. De plus, le microenvironnement tumoral adopte des stratégies d'évasion immunitaires pour entraver l'activité cytotoxique des cellules par la sécrétion de différents facteurs les affectant. En effet, ces interactions cellulaires influencent les propriétés phénotypiques et fonctionnelles des différentes cellules constituant la tumeur (95).

2.1.3 Interactions cellulaires par la sécrétion de différents facteurs

Parmi les facteurs libérés par les cellules du microenvironnement, le TGF-B, ainsi que d'autres signaux inflammatoires tels que les interleukines (IL-6, IL-8) et le facteur de nécrose tumorale (TNF) jouent un rôle dans l'activation des CAF, et l'interaction avec les cellules immunitaires ainsi que leur inactivation (88, 96). De plus, plusieurs cytokines et chimiokines inflammatoires relâchées par les CAF et les TAM telles que l'IL-6, l'IL-8, le VEGF-A, le ligand du motif CC de la chimiokine (CCL)-2, et le ligand du motif CXC (CXCL)-12 activent la transcription STAT-3 et la signalisation ERK1-2 dans les cellules tumorales favorisant leur prolifération et leur survie. Dans le cas de l'infiltration des cellules immunitaires, le VEGF et l'IL-8 stimulent l'angiogenèse et le CCL2 est un chimio attractant pour les monocytes, les macrophages et les cellules NKT invariantes (iNKT) et NKT qui seront par la suite inactivés de manière importante par le TGF-B (88, 97, 98).

La croissance des cellules de neuroblastome est régulée par des facteurs de croissance comprenant le facteur de croissance nerveux (NGF), le facteur neurotrophe dérivé du cerveau (BDNF), et la neurotrophine 3 (NT3) qui agissent sur les récepteurs tyrosine kinase de la neurotrophine (TrkA, B et C) ayant des effets sur la prolifération et la différenciation cellulaire (31).

La production du facteur de croissance lié à l'insuline (IGF1 et 2) par les cellules tumorales induit la dégradation osseuse par l'activation des ostéoclastes dont le rôle est de détruire l'os, ce qui a pour conséquence une augmentation des métastases osseuses par la liaison au récepteur de l'IGF (IGFR) présent sur le neuroblastome (99).

D'autre part, par mécanisme d'adhésion, la communication entre les cellules se fait par l'utilisation de récepteurs et de molécules d'adhésion VCAM1 et ICAM1 dont l'expression augmente via les cytokines inflammatoires TNF- α et IFN-gamma (99, 100). Les effets des intégrines sur la progression du neuroblastome dépendent de leur famille ainsi que du type cellulaire impliqué dans l'interaction (99).

Ainsi, les différentes caractéristiques de progression tumorale tels que la prolifération, la résistance immunitaire, l'angiogenèse, la résistance à l'apoptose, les métastases, l'instabilité génomique, le métabolisme et l'inflammation sont affectées par la présence de cellules dans le

TME et par les interactions entre elles qui se font par la sécrétion de différents facteurs (Figure 11) (99). L'identification de ces facteurs est une composante essentielle afin de caractériser les changements phénotypiques et d'activité de certains types cellulaires dans ce contexte.

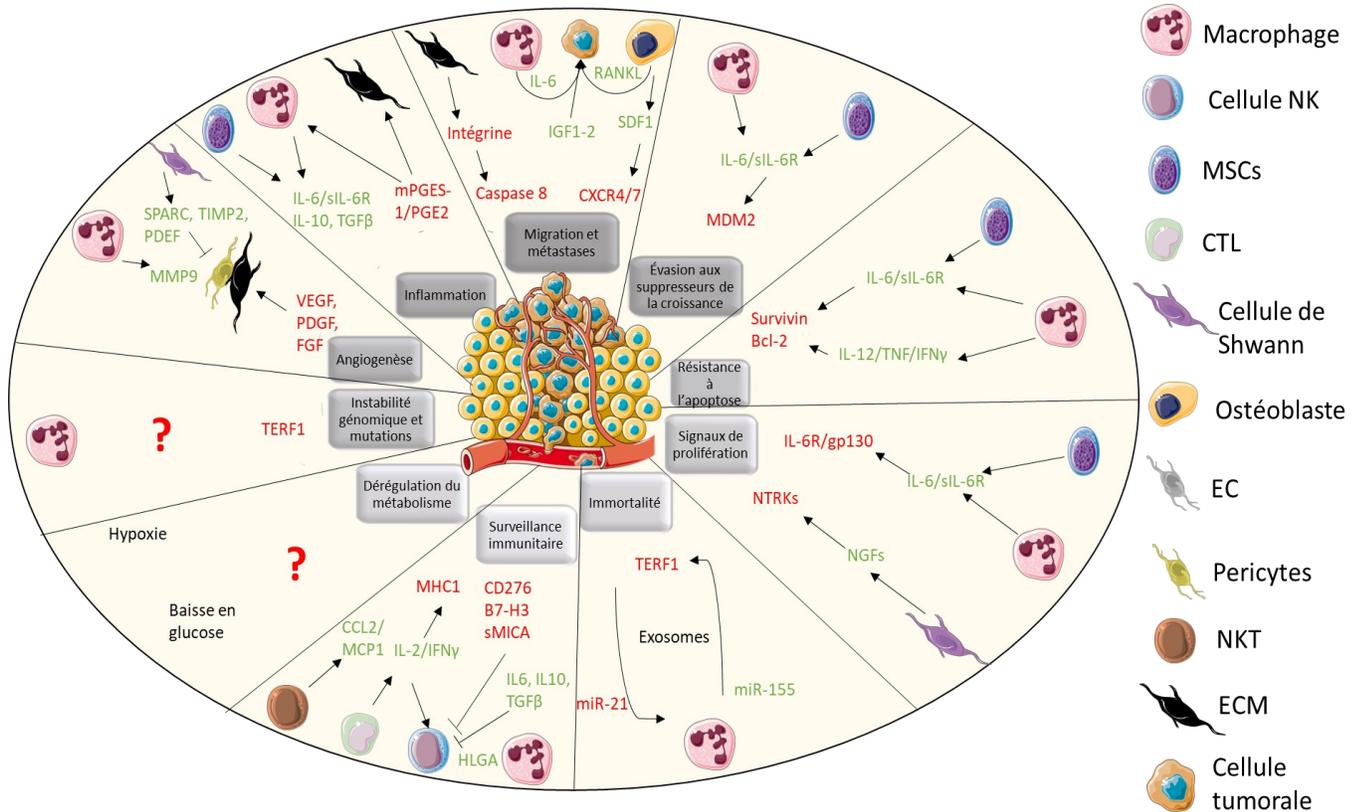


Figure 11. – Effets du TME sur les propriétés tumorales. Adaptée de (99) et (101). Éléments graphiques tirés de Servier Medical Art.

2.2 Rôle des cellules NK dans le neuroblastome

2.2.1 Développement des cellules NK

Les cellules NK représentent 10-15% des lymphocytes du sang périphérique (PBL) et sont identifiées de manière phénotypique par les antigènes à la surface CD56 (NCAM) et CD16 (FcγRIII) (102). Comme leur nom l'indique, les cellules NK sont "naturellement" cytotoxiques et, contrairement aux cellules T cytotoxiques, ne nécessitent pas d'exposition

préalable à l'antigène pour exercer leurs effets anti-tumoraux. Les cellules NK sont présentes dans plusieurs tissus lymphoïdes et non lymphoïdes, notamment la moelle osseuse (BM), les ganglions lymphatiques (LN), la peau, les intestins, les amygdales, le foie et les poumons (103). Les cellules NK font partie de la famille des cellules lymphoïdes innées (ILC). Celles-ci sont classées en trois groupes. Les ILC du groupe 1 sont définies par leur capacité à produire de l'interféron- γ (IFN γ). Les ILC du groupe 2 sont capables de produire des cytokines associées aux cellules T helper 2 (TH2), notamment l'interleukine-5 (IL-5) et l'IL-13. Finalement, les ILC du groupe 3 produisent de l'IL-17 et de l'IL-22. Les cellules NK sont apparentées aux ILC du groupe 1, car elles produisent de l'interféron gamma (IFN- γ) et du facteur de nécrose tumorale (TNF)- α lors de leur stimulation. Cependant, contrairement aux autres ILC du groupe 1, les cellules NK ont des fonctions cytolytiques qui ressemblent à celles des lymphocytes T cytotoxiques CD8 + (103). Au cours du développement, un processus appelé « éducation », décrit l'interaction des cellules NK exprimant des motifs inhibiteurs à base de tyrosine des immunorécepteurs (ITIM) avec le complexe majeur d'histocompatibilité-I (MHC-I), aide les cellules NK à devenir actives et à éviter d'attaquer les cellules normales saines (104).

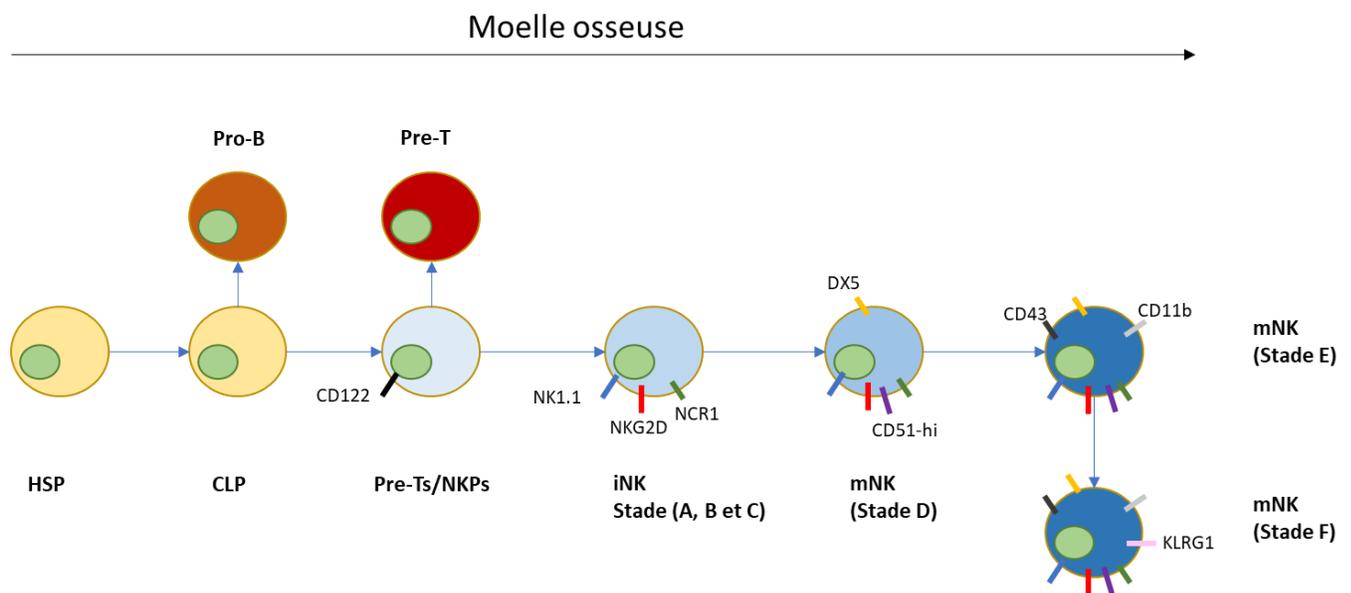


Figure 12. – Développement des cellules NK à partir des cellules souches hématopoïétiques (HSC) dans la moelle osseuse. Adaptée de (104).

Les cellules NK sont différenciées à partir des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) qui donnent lieu à tous les leucocytes (Pro-B, Pre-T, cellules lymphoïdes innées) et globules rouges (105). Les progéniteurs des NK (NKP) se différencient en cellules NK immatures avec l'expression du récepteur activateur NKG2D par le CD112 (103, 106). De plus, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) produisent également un autre récepteur de chaîne gamma commun (γ cR)-cytokine de liaison et l'IL-21 qui peut aider à l'expansion des NKP. Une production de CXCL12 stimule les NKP via CXCR4 pour faire mûrir fonctionnellement les NKP ou les cellules NK immatures (iNK) en sous-ensembles établis de cellules NK matures (mNK). L'expression de CD51 (Integrin α V) et CD49b (DX5, Integrin VLA-2 α) définit le stade initial des cellules mNK. L'expression de CD43 (leucosialine), de CD11b (Mac-1) et l'acquisition de Ly49 définissent le stade terminal des cellules mNK (Figure 12) (103, 107). D'autres types de cellules : les péricytes, les mégacaryocytes, les adipocytes, les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocytes aident à former la niche de la moelle osseuse et d'autres systèmes de soutien constituant le site de développement des cellules NK. Finalement, les cellules mNK circulent vers les organes lymphoïdes secondaires via les vaisseaux sanguins sinusoïdaux. (104).

2.2.2 Rôle des cytokines dans l'activité des cellules NK

Les cytokines sont des médiateurs inflammatoires essentiels qui contrôlent de multiples aspects de la biologie des cellules NK. Les cellules NK expriment les récepteurs des cytokines au début de leur développement et nécessitent une signalisation via la chaîne gamma commune (γ c) pour leur développement, leur homéostasie et leur fonction (103). Les interleukines IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 lient la chaîne gamma commune (108).

Les interleukine-2 et 15 interagissent à travers des complexes constitués des chaînes γ c et IL-2R β entraînant l'activation de STAT1 et STAT5 par JAK-1 et JAK-3 respectivement. L'IL-2R α (CD25) est exprimé sur les cellules NK activées et augmente leur affinité pour l'IL-2 qui entraîne leur prolifération et la production de molécules lytiques telles que la perforine et la Granzyme B (103, 109). L'interleukine-15 soluble se lie à l'IL-15R α sur les cellules présentatrices de surface qui le présentent aux cellules NK exprimant les hétérodimères IL2-R β / γ c. L'IL-15 est présentée par les cellules dendritiques (CD) et les macrophages ainsi que par les cellules non hématopoïétiques, y compris les cellules stromales et les cellules épithéliales (103, 110). Finalement, l'IL-21R utilise

l'IL-21R α et le γ_c et est en synergie avec l'IL-2 pour augmenter l'expression de NKG2A, CD25, CD86, CD69, Perforine et Granzyme B (qui présentent les granules cytotolytiques des cellules NK) et ainsi augmenter la cytotoxicité (111).

Ces cytokines qui utilisent les récepteurs à base γ_c sont le lien entre les cellules NK et les cellules qui les produisent. En effet, les cellules auxiliaires T qui produisent l'IL-21 peuvent réguler les niveaux d'expression des récepteurs d'activation ou le contenu cytotolytique de Perforine et Granzyme B dans les cellules NK (103).

2.2.3 Balance de signaux activateurs et inhibiteurs dans l'activation des cellules NK

Les mécanismes moléculaires qui régulent la cytotoxicité des cellules NK et peuvent être divisés en trois processus principaux dont la reconnaissance des cellules cibles, le contact avec les cellules cibles et la formation de synapses immunologiques (SI) (103). En tant que principal type de cellule effectrice de l'immunité innée, les cellules NK sont capables de tuer les cellules tumorales et les cellules infectées par le virus à un stade très précoce (104).

Les signaux d'activation vont passer par les récepteurs de liaison aux cytokines, les intégrines, les récepteurs tueurs (CD16, NKp40, NKp30 et NKp44). Ils peuvent être divisés en au moins trois types selon leurs ligands (Figure 13) (104) :

-les récepteurs spécifiques du MHC-I,

-les récepteurs liés au MHC-I et les récepteurs non liés au MHC-I.

-Les NCR, qui appartiennent au troisième groupe, comprennent trois molécules (NKp30, NKp44 et NKp46).

Les signaux inhibiteurs comprennent principalement les récepteurs reconnaissant le MHC-I, tels que Ly49s, NKG2A et LLT1, ainsi que certains récepteurs non apparentés au MHC-I. De plus, les récepteurs inhibiteurs spécifiques du CMH-I peuvent être généralement divisés en trois types selon leur structure et leur fonction (Figure 13) (104) :

-les récepteurs de type immunoglobuline (KIR),

-les récepteurs de type lectine (KLR)

-les récepteurs de type immunoglobuline leucocytaire (LILR).

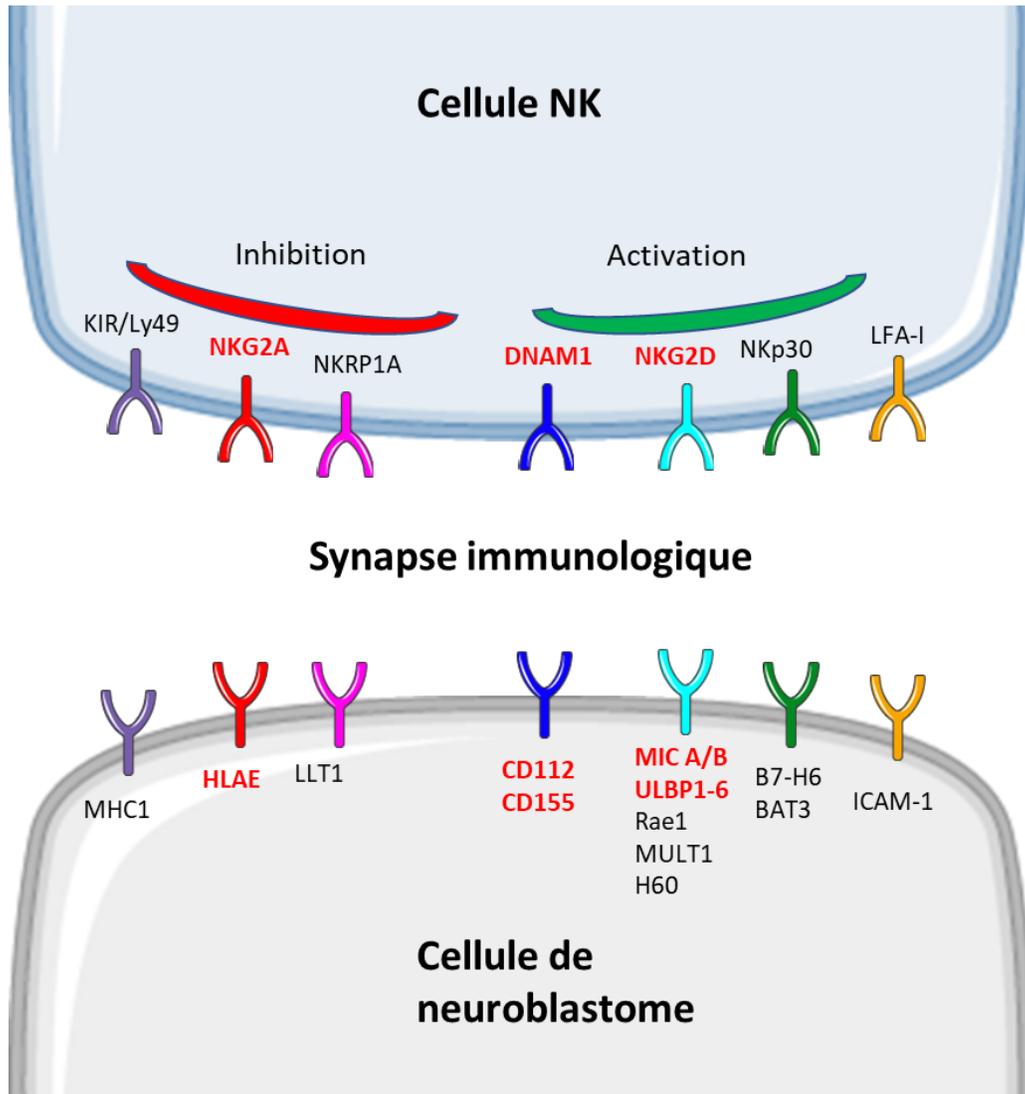


Figure 13. – Récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK ainsi que leurs ligands. Adaptée de (112). Éléments graphiques tirés de Servier Medical Art.

Les récepteurs activateurs de l'activité cytotoxique des cellules NK : DNAM1 et NKG2D et le récepteur inhibiteur NKG2A ainsi que leurs ligands représentent les principales cibles altérées dans les tumeurs résistantes aux cellules NK par diminution et par augmentation de leur expression (113, 114).

2.2.3.1 Description des récepteurs activateurs NKG2D et DNAM1

NKG2D est un récepteur de type lectine de type C exprimé à la surface des cellules et a été classé comme récepteur de lectine des cellules tueuses de la superfamille K, membre 1 (KLRK1) (113, 115). Cet homodimère reconnaît un certain nombre de ligands de type CMH de classe I induits par le stress : il se lie aux protéines MICA et MICB (MHC class I chain-related protein A and B), aux protéines de liaison UL-16 (ULBP). Il y a six membres de la famille de protéines ULBP, qui sont étroitement liées aux molécules Rae1 chez la souris. ULBP1, -2, et -3 et -6 sont ancrés au GPI, tandis que ULBP4 et ULBP5 (RAET1E et -G) sont des protéines transmembranaires. Une liaison des récepteurs à ces ligands entraîne une augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK. Ainsi, des cellules saines expriment très peu ces protéines. (113, 116).

DNAM1 est une glycoprotéine transmembranaire exprimée de manière constitutive sur la majorité des cellules T, des cellules NK et des macrophages (113, 117). Ses ligands sont la nectine-2 (CD112) et le récepteur du poliovirus (PVR, CD155), qui appartiennent à la famille de la nectine/nectine-like. CD155 est également exprimé sur les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les cellules présentatrices d'antigène. CD112 est exprimée sur les cellules épithéliales. Des études *in vitro* ont montré que DNAM1 déclenche la destruction par les cellules NK des cellules tumorales exprimant CD155 et CD112 (113, 118).

2.2.3.2 Description du récepteur inhibiteur NKG2A

Le récepteur hétéromère CD94/NKG2A qui se lie à la molécule HLA-E du CMH non classique conservée est le premier récepteur inhibiteur exprimé par les cellules NK en développement et immatures. Au cours de leur maturation, les cellules NK l'expression de leurs récepteurs augmentent. Ces groupes de récepteurs transmettent des signaux inhibiteurs. La famille des récepteurs inhibiteurs des Ig tueuses (KIR) sont caractérisés par 2 ou 3 domaines extracellulaires de type Ig et une longue queue cytoplasmique. Ils reconnaissent des déterminants allotypiques partagés par divers groupes de molécules HLA de classe I (114, 119). Les KIR et NKG2A ont été appelés « points de contrôle immunitaire des cellules NK » pour leur capacité à inhiber les fonctions des cellules NK et pour leur potentiel en tant que cibles thérapeutiques, par analogie avec les points de contrôle immunitaire associés aux cellules T PD-1 et CTLA-4 (119, 120).

2.2.3.3 Activité cytotoxique

Les cellules NK exercent une activité cytotoxique antitumoral par la sécrétion d'enzymes cytolytiques dont la granzyme A et B et la perforine. La mort des cellules cibles est induite le plus efficacement lorsque ces granzymes sont libérées en même temps que la présence de la molécule de délivrance, la perforine. L'activation de la voie de dégranulation est définie par l'expression du récepteur CD107a/b à la surface des cellules NK à la suite d'un contact avec des cellules cibles (121, 122). La mort des cellules cibles peut également être induite via l'activité de la caspase 8 et du récepteur TRAIL surexprimés par la liaison aux cellules NK (123, 124). Finalement, au cours de l'inflammation, les cellules NK intègrent les ganglions lymphatiques et influencent la réponse des lymphocytes T. En effet, ils promeuvent la polarisation cellulaire TH1 en libérant de l'IFN γ et passent par le biais de cellules présentatrices d'antigènes en les activant. Durant le développement, en éliminant les cellules dendritiques immatures et en favorisant la maturation des autres cellules immunitaires (lymphocytes et macrophages), les cellules NK jouent un rôle dans la régulation de l'activité immunitaire impliquant les autres cellules (123).

2.2.4 Inhibition de la cytotoxicité des cellules NK dans le neuroblastome

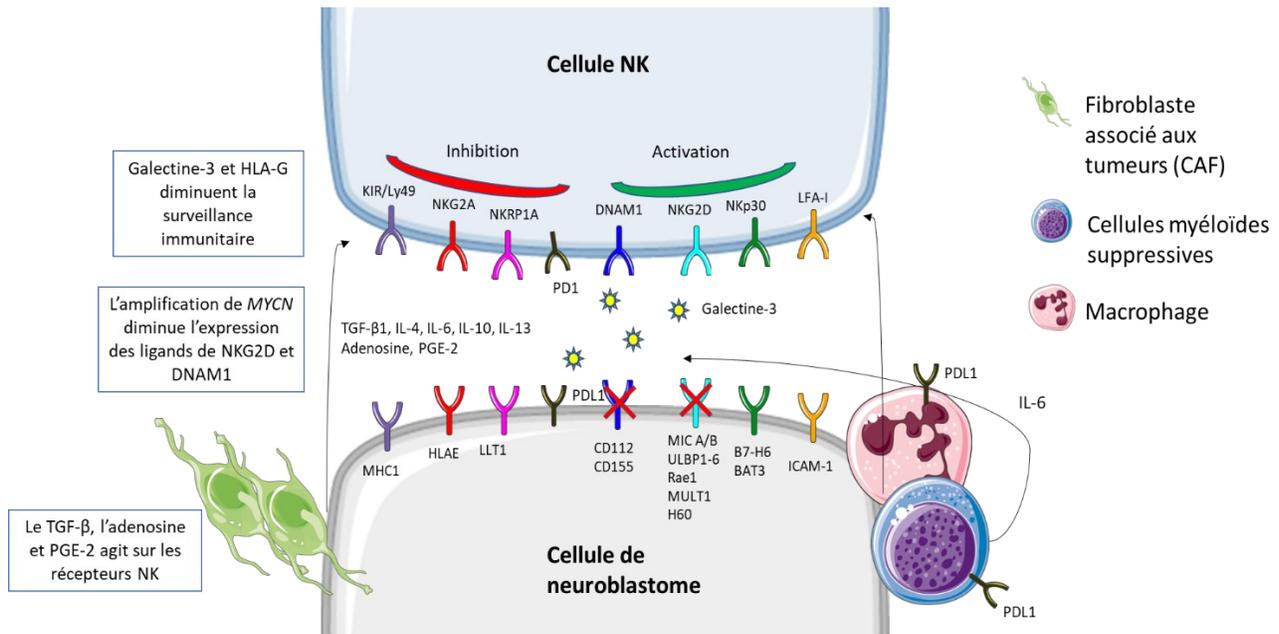


Figure 14. – **Intéraction du TME avec les cellules NK et les cellules de neuroblastome.** Adaptée de (125). Éléments graphiques tirés de Servier Medical Art.

MYCN diminue l'expression des ligands CD112/CD115 et MICA/MICB/ULBP1-6 pour NKG2D et DNAM-1 dans les cellules du neuroblastome, entraînant une réduction de la reconnaissance des NK et de la cytotoxicité (Figure 14). La libération de TGF- β 1 par les cellules du microenvironnement dont les CAFs diminue l'expression des récepteurs activateurs, notamment NKG2D, DNAM1, NKp44 et NKp30. De plus, la cytotoxicité associée aux cellules NK peut également être altérée par les cellules stromales, comme par exemple les fibroblastes, les monocytes, les macrophages et d'autres cellules immunitaires associées au cancer. Les fibroblastes dans le TME induisent une perte d'activité des cellules NK en diminuant les ligands des récepteurs d'activation des cellules NK, en améliorant l'enrichissement des macrophages associés à la tumeur et en produisant des composants de la matrice extracellulaire tels que l'indoleamine (IDO) et la prostaglandine E2 (PGE2) importants pour l'activité des récepteurs de la synapse immunologique (Figure 14) (104, 125).

Dans le neuroblastome, les différents facteurs relâchés par les cellules du microenvironnement tumoral comprenant les fibroblastes, les TAM viennent influencer l'activité des récepteurs activateurs; principalement DNAM1 et NKG2D; et des récepteurs inhibiteurs dont NKG2A. D'autre part, sur le compartiment tumoral au niveau de la synapse immunitaire, les ligands de ces récepteurs : CD112, CD155, ULBP 1-6, MICA et B et la famille des récepteurs HLA ont une expression variable, favorisant la résistance immunitaire (125-128). C'est aussi le cas dans les cellules souches leucémiques, où il a été démontré que l'absence du récepteur NKG2D ou de l'expression des ligands sur les cellules cibles conduit au développement tumoral par évasion immunitaire rendant les cellules NK inactives (129).

Les phosphatidylinositol 3 kinases de classe IA (PI3K) sont impliquées dans la croissance et la survie des cellules normale avec un rôle de transduction du signal à partir des récepteurs membranaires. L'inhibition des signaux d'activation anormale de PI3KCB avec un inhibiteur testé appelé P110 β dans les hémopathies malignes améliore la sensibilité des tumeurs à l'activité des cellules NK in vitro. L'effet de P110 β est impliqué en aval des ligands des récepteurs inhibiteurs

de la synapse immunologique, dont le mécanisme d'action est probablement défini par la régulation du CMH-I comprenant le ligand du récepteur NKG2A : HLA-E (104, 130).

Finalement, dans le TME, la fonction des cellules NK peut-être altérée par des cytokines suppressives, mais également par des conditions métaboliques inappropriées, imposées notamment par l'hypoxie, le manque de nutriments et des concentrations anormales de produits dérivés de tumeurs. Par exemple, le lactate induit une acidification défavorable pouvant induire des changements métaboliques et épigénétiques (acétylation des histones et méthylation de l'ADN) sur les cellules NK ou d'autre part sur les cellules tumorales induisant une dérégulation de la balance au niveau de la synapse immunologique (104, 131, 132). En effet, plusieurs études ont souligné l'importance d'un apport suffisant en glucose pour les activités des cellules NK, y compris la capacité proliférative, le statut d'activation, la production de cytokines et la cytotoxicité directe (104, 133).

Type de cancer	Rôle des cellules NK
Lymphome/ Leucémie	Les cellules CAR-NK exprimant l'anti-CD19 démontrent une forte cytotoxicité des cellules NK vers les cellules leucémiques.
Neuroblastome	Les taux de CD155 sont en corrélation avec la cytotoxicité des cellules NK chez le patient.
Carcinome hépatocellulaire	La réduction de l'expression de ULBP1 et MICA/MICB est corrélée à une récurrence précoce et à une réduction de la survie globale chez les patients.
Cancer du sein	Les souris IL15- présentent des métastases accrues du cancer du sein d'une manière dépendante des cellules NK. Les cellules souches mésenchymateuses surexprimant Sirt1 inhibent la croissance tumorale du sein par le recrutement de cellules NK.

Fibrosarcome	Les souris déficientes en récepteurs DNAM1 présentent une augmentation du développement du fibrosarcome.
Cancer cervical	MICA/B et ULBP1 prédisent indépendamment une meilleure survie globale chez les patientes atteintes d'un cancer du col de l'utérus.
Cancer de la prostate	Les souris déficientes en NKG2D développent des tumeurs de la prostate défectueuses dans la surveillance tumorale.
Gliome	La surexpression du MICA sensibilise les cellules de gliome à la cytotoxicité médiée par les cellules NK.
Cancer colorectal	Une expression plus élevée du MICA est en corrélation avec une meilleure survie des patients atteints de cancer colorectal.
Mélanome	Le blocage des récepteurs NCR et DNAM1 à l'aide d'anticorps spécifiques réduit la destruction des cellules NK des cellules de mélanome.
Myélome multiple	Le ligand NKp30 BAT3 favorise la lyse tumorale d'une manière dépendante des cellules NK.
Cancer des voies aérodigestives supérieures	Les patients avec une forte activité des cellules NK ont une meilleure survie sans maladie.
Carcinome à cellules rénales	Les cellules NK activées par l'IL-21 inhibent la croissance du carcinome à cellules rénales chez la souris.
Cancer du poumon	Le géfitinib améliore la régulation médiée par les cellules NK des cellules cancéreuses du poumon mutantes en EGFR.
Cancer de l'ovaire	L'épuisement de l'acide ascorbique réduit la cytotoxicité des cellules NK contre les cellules cancéreuses de l'ovaire. Le traitement à IL-2 retarde la croissance tumorale chez les souris SCID greffées avec un cancer de l'ovaire.

Cancer de l'endomètre	L'expression HLA-E prédit le bénéfice pronostique de l'infiltration des cellules NK dans le cancer de l'endomètre
Cancer du pancréas	L'inhibition du point de contrôle CD96 des cellules NK prévient la rechute du cancer du pancréas.
Cancer de l'estomac	Les cellules NK présentent une forte activité antitumorale contre les cellules cancéreuses gastriques.
Cancer de la thyroïde	Les cellules NK inhibent la croissance et les métastases du cancer de la thyroïde et l'éradiquent de manière dépendante de l'ULBP2/5/6

Tableau 2. – **Rôle de l'activités des récepteurs/ligands de la synapse immunologique dans l'activité et le contrôle de différentes tumeurs.** Adaptée de (132)

2.2.5 Régulation de la transcription modulant l'activité des cellules NK dans le cancer

L'effet des cellules immunitaires clés (cellules B et T ou cellules NK) contre les cellules cancéreuses est soumis à une régulation épigénétique. Par exemple, l'état épigénétique des cellules cancéreuses les rend vulnérables à la cytotoxicité immunitaire ou favorise l'évasion immunitaire (132).

Il a été démontré que plusieurs facteurs de transcription, notamment le facteur nucléaire kappa B (*NFkB*), *Cbl-C* et *RUNX3* modulent la fonction des cellules NK. En effet, le facteur nucléaire kappa B est un facteur de transcription clé pour la régulation de la production de cytokines et de chimiokines. Son rôle est important pour les fonctions effectrices des cellules NK ainsi que la reconnaissance de cellules cibles (134). En plus de son rôle de gène suppresseur de tumeur, *RUNX3* est impliqué dans la maturation des cellules NK et joue un rôle dans la différenciation de ces cellules et de leur activité (135).

Également, *p53*, un facteur de transcription généralement muté ou délété dans la moitié des cancers induit l'expression des ligands NKG2D, ULBP1 et ULBP2, stimule la production d'interféron gamma (IFN- γ) en coculture in vitro avec des cellules NK. De plus, *p53* induit la sénescence des

cellules cancéreuses et la clairance médiée par les cellules NK (132, 136). D'autre part, *MYC* coopère avec *Ras*, un oncogène coactivé pour provoquer une suppression immunitaire en partie en reprogrammant le stroma, qui est dirigé par le ligand de chimiokine à motif CC 9 et l'interleukine-23 (132, 137). De plus, *MYC* améliore l'expression de *PD-L1* dans les cellules cancéreuses, ce qui favorise l'évasion immunitaire et atténue la capacité des cellules NK à éliminer les cellules cancéreuses (132, 138).

Finalement, les protéines STAT jouent des rôles divers dans plusieurs processus biologiques et sont des régulateurs importants de la réponse immunitaire innée et adaptative (139). Par exemple, *STAT5* joue un rôle important dans la transduction du signal médiée par l'IL-2 et l'IL-15 et dans la promotion de la survie, de la cytotoxicité et de la maturation des cellules NK. L'inhibition de *STAT3* augmente la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis des cellules cancéreuses en augmentant les niveaux de la chaîne A liée au complexe majeur d'histocompatibilité de MICA en se liant directement à son promoteur (132, 140, 141).

Au niveau de la méthylation, *EZH2* inhibe l'expression de *ULBP1* et induit la sensibilisation des cellules de carcinome hépatocellulaire aux cellules NK de manière dépendante de la méthylation de l'ADN (à l'aide de *DNMT3A*) (132, 142). L'augmentation de la méthylation de la lysine 27 de l'histone 3 dans les cellules NK via l'inhibition de la déméthylase *JMJD3/UTX* a été associée à une réduction anti-inflammatoire de la production de cytokines, ce qui confirme l'importance de cette modification de l'histone dans l'activation des cellules NK. De même, l'enzyme de déméthylation spécifique de la lysine 4 triméthylée de l'histone 3, *Kdm5a*, est nécessaire à l'activation des cellules NK, et un déficit en cette enzyme réduit la production d'IFN- γ par les cellules NK activées, médiée en partie par *SOCS1* (132, 143).

3 – Thérapies contre le neuroblastome

Les thérapies actuelles dans la plupart des établissements en Amérique du Nord sont divisées en trois phases : l'induction, la consolidation et la thérapie post-consolidation ou d'entretien. Différents types de thérapies sont utilisées dont la chimiothérapie, la résection chirurgicale, la chimiothérapie à haute dose avec transplantation de cellules souches autologues (ASCT), la radiothérapie, l'immunothérapie et un traitement à base de rétinoïdes (144).

La moitié des patients ayant eu une rémission clinique après un traitement d'induction et de consolidation rechuteront ce qui indique la présence d'une maladie résiduelle résistante au traitement (145). Pour les patients atteints d'une maladie localisée, la résection chirurgicale seule est généralement curative, et la chimiothérapie démontre une bonne efficacité chez les patients ayant subi une rechute après la résection. Les tumeurs de stade peu avancé avec des caractéristiques biologiques favorables, ne métastasent pas même après une résection incomplète. Par conséquent, la chimiothérapie est réservée à ceux qui présentent des symptômes menaçant la vie ou les organes, tels que la compression de la moelle épinière ou aussi les troubles respiratoires (2). En plus de la résection chirurgicale, la radiothérapie est un autre élément important du contrôle local de la tumeur puisque les tumeurs du neuroblastome présentent une certaine radiosensibilité. La radiothérapie est généralement administrée après la fin de la thérapie de consolidation, mais jusqu'à récemment, il y avait peu de données publiées sur son efficacité. Les effets secondaires tardifs chez les enfants atteints de cancer sont une conséquence de la radiothérapie, probablement en raison de la sensibilité des tissus normaux en croissance et en développement et de l'espérance de vie plus longue des patients qui survivent (2). Les patients atteints de neuroblastome à haut risque entrent généralement dans la phase de maintien du traitement après la fin de la chimiothérapie d'induction, de la résection chirurgicale et de la radiothérapie. Plusieurs options de traitements post-consolidation ont été étudiées afin d'éradiquer la maladie résiduelle et d'améliorer encore les taux de survie sans événement (2).

3.1 Stratégies ciblant l'amplification de MYCN

Le développement d'inhibiteurs ciblant les protéines MYC a été difficile, car les protéines MYC/MYCN sont composées de deux hélices alpha étendues sans site catalytique. Les stratégies pour contourner le blocage direct de MYCN comprennent : le ciblage des protéines de lecture épigénétique, telles que les modules de liaison à l'acétyl-lysine (bromodomaines) qui lient les marques de la chromatine permettant le recrutement de MYC/MYCN, le ciblage des régulateurs de l'ARNm de MYCN, la dérégulation de la stabilité de MYCN en ciblant PI3K qui permet la phosphorylation sur ce dernier ou en ciblant des protéines bloquant la déphosphorylation à T58 stabilisant MYCN (comme l'aurora kinase A par exemple). MYCN peut être ciblée aussi par l'activation de l'apoptose induite par p53 en supprimant MDM2 (avec l'utilisation de la Nutlin-3 et MI-63) et le déclenchement de la différenciation avec l'acide rétinoïque, l'oxyde nitrique, phénylacétate ou par l'inhibition des HDACs par exemple. Bien que MYCN inhibe les voies de différenciation, chacune de ces molécules réduit également les niveaux de MYCN, ce qui indique que les tumeurs amplifiées par MYCN peuvent encore se différencier afin de supprimer la prolifération et de favoriser l'apoptose (146, 147).

3.2 Traitements épigénétiques ciblant les DNMT et les HDAC

Les ADN méthyltransférases (DNMT), fréquemment surexprimés dans les cancers, forment des cibles intéressantes dans la découverte de nouveaux traitements. Les approches de traitement sont divisées en deux types : la première agit principalement sur une seule cible de DNMT (5-aza par exemple), tandis que la seconde cible les DNMT en combinaison avec d'autres enzymes clés (en combinaison avec des inhibiteurs de HDAC), ce qui améliorera considérablement l'efficacité et la probabilité de guérison du patient (148). Les expressions de DNMT3A/B sont plus élevées dans les neuroblastomes à haut risque, et ces enzymes sont surexprimées dans les cellules résistantes au cisplatine (149). Différents inhibiteurs de DNMT ont été développés, dont le 5-azadésoxycytidine (5-aza ou décitabine) qui induit une baisse de prolifération des cellules tumorales dans un contexte *in vitro*. Lorsqu'utilisé en combinaison, il peut potentialiser l'efficacité des médicaments chimiothérapeutiques actuellement disponibles comme le cisplatine, la

doxorubicine et l'étoposide (150, 151). La décitabine a été étudiée en combinaison dans un essai de phase I sur des tumeurs solides récidivantes. À faible dose, lorsqu'elle est associée à la doxorubicine/cyclophosphamide, sa toxicité est tolérable chez les enfants. Cependant, les doses capables de produire des effets biologiques cliniquement pertinents n'ont pas été bien tolérées avec cette association (152). Le prétraitement des cellules épithéliales tumorales avec le 5-aza-déoxycytidine a considérablement réduit les altérations du nombre et de l'état d'activation des cellules immunitaires dont les cellules NK, et l'augmentation de la survie globale. Le traitement des cellules cancéreuses de l'ovaire avec le 5-aza-déoxycytidine a également augmenté la signalisation IFN, qui était nécessaire pour les effets suppresseurs de tumeurs (132, 153). Une étude montre que les gliomes mutants IDH1 et IDH2 échappent à la surveillance immunitaire des cellules NK par une régulation négative basée sur la méthylation de l'ADN de ULBP1 et ULBP3. Ces ligands ont été réexprimés lors du traitement cellulaire avec le 5-aza-déoxycytidine, ce qui a conduit à la lyse des cellules de gliome par les cellules NK. Dans certains types de cancer, y compris la leucémie myéloïde aiguë, les mutations IDH1 et IDH2 entraînent une hyperméthylation globale de l'ADN en raison de la réduction des taux d' α -cétoglutarate et de l'inhibition de la déméthylase de l'ADN médiée par l'enzyme TET2 (132, 154).

D'autre part, l'identification de la surexpression de HDAC8 et HDAC10 dans le neuroblastome a conduit à la recherche de composés appartenant à la famille des inhibiteurs de HDAC (iHDAC) comme nouvelle approche thérapeutique (68). Par exemple, le traitement avec l'acide valproïque inhibe la prolifération cellulaire, induit l'apoptose et la différenciation dans des cellules du neuroblastome (151, 155). De plus, le vorinostat (acide subérylanilide hydroxamique ou SAHA), un autre inhibiteur des HDACs, entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, suivi de l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Finalement, *in vitro*, des effets anticancéreux synergiques ont été décrits lorsque le SAHA est combiné avec l'inhibiteur du protéasome MG132 dans la lignée de neuroblastome SH-SY5Y (151, 156, 157). Un essai clinique et une étude de pharmacocinétique de phase I sur le vorinostat a été menée chez des personnes atteintes de tumeurs solides incluant le neuroblastome, et s'est avérée présenter une dose maximale tolérée de 230 mg/m²/jour démontrant une bonne tolérance. Aussi, un essai de phase II de thérapie combinée a été menée, en comparant le traitement avec le I-MIBG seul (à 18 mCi/kg le premier

jour de traitement) ou en combinaison avec le vorinostat chez les patients atteints de neuroblastomes résistants ou en rechute (151). Parmi la classe des inhibiteurs des HDACs, le vorinostat (à 180 mg/m²/dose pendant 12 jours) est le médicament qui donne le taux de réponse le plus élevé, avec une toxicité acceptable dans cet essai de combinaison sur 105 patients. En effet le taux de toxicité passe de 19% en monothérapie à 35% en combinaison comparativement à un taux de 49% en combinaison avec d'autres médicaments dont la vincristine (158). Finalement, comme discuté dans le chapitre 1, le panobinostat en combinaison avec JQ1 (un inhibiteur de BET), induit une inhibition de croissance synergique et une apoptose dans les cellules de neuroblastome accompagnée d'une baisse d'expression de *MYCN* bloquant la progression tumorale chez les souris (151). Ainsi, les thérapies épigénétiques ciblant l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN démontrent un aspect prometteur. L'un des défis est de diminuer les effets secondaires. L'une des solutions est le développement de la thérapie combinée qui permet de cibler différentes voies et de diminuer les doses administrées de chaque régulateur (151).

3.3 Traitements d'immunothérapies

À ce jour, parmi les travaux d'immunothérapie les plus importants pour les tumeurs solides pédiatriques, on retrouve les études d'efficacité des anticorps anti-disialoganglioside (GD2) contre le neuroblastome (159). L'antigène glucidique GD2 est une cible appropriée pour la thérapie par anticorps car il est abondamment exprimé dans la plupart des cellules de neuroblastome et son expression est faible dans les cellules normales, y compris celles des nerfs périphériques. Les anticorps anti-GD2 induisent la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) via des cellules Natural Killer (NK) (159). Le dinutuximab est un anticorps monoclonal qui cible GD2. L'effet de cet anticorps monoclonal est augmenté par deux autres agents, le GM-CSF et l'IL-2. Le but de l'administration de ces agents en association avec le dinutuximab est de stimuler la réponse immunitaire. L'IL-2 stimule les cellules tueuses naturelles et le GM-CSF active la cytotoxicité des granulocytes et des macrophages. Une fois que le dinutuximab a reconnu l'antigène GD2 sur les cellules du neuroblastome, les cellules du système immunitaire sont alors capables de lyser les cellules cibles. Le quatrième agent administré pendant l'immunothérapie est l'isotrétinoïne. L'isotrétinoïne est un agent différenciateur qui

induit la maturation des cellules de neuroblastome (160, 161). L'utilisation de cette méthode prolonge la survie, cependant, moins de 40% survivent plus de 5 ans sans rechute (162).

À la suite de leur succès dans les leucémies, les CAR-T se révèlent comme une approche prometteuse pour l'immunothérapie basée sur la reconnaissance immunitaire dans les tumeurs froides. La validation des anti GD2 dans le neuroblastome a conduit au premier essai clinique des CAR-T dans le cadre des tumeurs pédiatriques présentant le même antigène de reconnaissance que le dinutuximab. Le traitement n'a démontré aucune neurotoxicité grâce à la faible expression de GD2 sur les cellules normales dont les nerfs périphériques (162, 163). Les résultats ont été décevants en raison du manque de réponses cliniques même en combinaison avec des inhibiteurs de point de contrôle du cycle cellulaire (PD-1) (162, 164).

Plusieurs autres molécules ont été identifiées à la surface des cellules de neuroblastome et ont été ciblées dans des modèles précliniques et en phase précoce d'essais cliniques. Par exemple, B7-H3 (CD276) qui est une molécule de point de contrôle du cycle cellulaire ou « checkpoint » (de la même famille que PD-L1) est surexprimé sur les cellules de neuroblastome et dans la plupart des autres tumeurs solides pédiatriques, mais elle a une faible expression sur les tissus normaux. Un anticorps nommé 8H9 est en cours de développement en conjugaison avec l'omburtomab, un anticorps monoclonal radiomarqué, pour le traitement de patients atteints d'un neuroblastome propagé au système nerveux central (SNC) et d'autres tumeurs malignes primaires du SNC (162, 165).

Ainsi, l'avantage de l'immunothérapie comparativement aux autres stratégies de traitements est celle d'une toxicité aiguë ou chronique moindre. Le principal défi est celui d'augmenter l'efficacité des traitements. En effet, les cellules CAR T induisent une réponse clinique chez les patients du Nouveau-Brunswick par exemple. Cependant, leur succès est limité en raison de difficultés de sélection de l'antigène cible, d'un manque de persistance des lymphocytes T et d'un microenvironnement tumoral suppressif démontrant le manque de réponses cliniques (151, 166).

3.4 Limites des traitements actuels

3.4.1 Résistance à la chimiothérapie

Compte tenu de l'hétérogénéité de la maladie et de la résistance développée aux traitements, la guérison après une rechute de neuroblastome progressif est très difficile (167). La présence de cellules souches initiatrices de tumeurs dans les cancers pourrait être responsable de la progression et de la rechute du cancer (168). Ces dernières possèdent plusieurs propriétés dont la capacité d'auto-renouvellement, la capacité de se développer en différentes lignées et leur potentiel prolifératif. Il existe deux hypothèses sur leur origine : la première suppose que les CSC peuvent provenir de cellules souches normales, et la seconde suppose que les cellules différenciées acquièrent les propriétés des CSC. Les cellules CD133+ (CD133 est un marqueur de CSC dans certaines tumeurs) isolées à partir de lignées cellulaires de neuroblastome, d'ostéosarcome et de sarcome d'Ewing sont résistantes au cisplatine, au carboplatine, l'étoposide, doxorubicine ainsi que plusieurs traitements de chimiothérapie comparativement aux CD133- (169). Cette fonction est attribuée à la possession de multiples mécanismes, y compris la répression de l'apoptose, l'augmentation de la réparation des dommages à l'ADN, la dormance conservée et la réponse médicamenteuse diminuée. Ainsi, leur présence définit la progression de la maladie, la rechute ainsi que le mauvais pronostic (167, 170). D'un point de vue clinique, une chronologie de survie décroissante est observée au niveau de la rechute des patients. Une étude au Nouveau-Brunswick a montré que la 1^{re} rechute arrive en 18 mois, la 2^e rechute en 8,7 mois et la 3^e rechute en 3,8 mois (171). Plusieurs stratégies ont été mis en place afin de cibler les CSC dans le neuroblastome dont le ciblage de marqueurs de surface spécifiques, la modulation des voies de signalisation, l'ajustement des signaux du microenvironnement, l'inhibition des pompes à efflux de médicaments, la modulation des miARN et l'induction de l'apoptose et de la différenciation des CSC. L'immunothérapie est souvent utilisée en association avec la chimiothérapie et la radiothérapie. Elle implique l'utilisation d'anticorps qui ciblent des marqueurs spécifiques des cellules souches cancéreuses (167).

3.4.2 Développement d'effets secondaires

Des complications tardives surviennent fréquemment chez les survivants d'un neuroblastome de stade avancé. La majorité de ces problèmes sont de gravité légère à modérée (172). En effet, dans une étude de suivi de plusieurs patients traités par chimiothérapie d'induction, la taille des enfants était significativement affectée et les patients présentaient une hypothyroïdie, une insuffisance ovarienne, une perte auditive et des problèmes dentaires. D'autres effets comprenaient un dysfonctionnement cardiaque, une scoliose et des besoins éducatifs spéciaux ont été rapportés. De plus, sur les 51 patients pris en compte dans cette étude, un patient a développé un cancer métastatique de la thyroïde, deux autres patients sont décédés d'un neuroblastome progressif et un a rechuté après la collecte initiale des données (173). Ainsi, les complications les plus fréquentes retrouvées comprennent les affections impliquant l'audition, le système endocrinien et le développement de cancers secondaires.

Finalement, dans le cas de l'immunothérapie, l'administration du dinutuximab est associée à des effets secondaires importants. Les effets sont généralement de nature aiguë et disparaissent généralement une fois le traitement terminé. Les effets indésirables les plus fréquemment observés sont la douleur neuropathique (52 %), la fièvre (39 %), l'infection (39 %), l'hypokaliémie (35 %), la réaction d'hypersensibilité (25 %), le syndrome de fuite capillaire (23 %), l'hyponatrémie (23 %), transaminite (élévation de l'alanine transaminase [ALT] 23 % ; élévation de l'aspartate transaminase [AST] 10 %), effets secondaires gastro-intestinaux (nausées, vomissements, diarrhée ; 22 %), hypotension (18 %), hypoxie (13 %) et urticaire (13 %) (161).

Ainsi, un besoin urgent est notable dans le but de réduire la morbidité et la mortalité, et d'améliorer la qualité de vie de tous les survivants du neuroblastome.

3.5 Immunothérapie basée sur les cellules NK

De nouvelles avancées dans la manipulation des cellules NK et dans la compréhension de leurs mécanismes moléculaires impliqués dans l'activité antitumorale ont permis le développement de plusieurs approches visant à améliorer la cytotoxicité des NK contre les cellules cancéreuses (174).

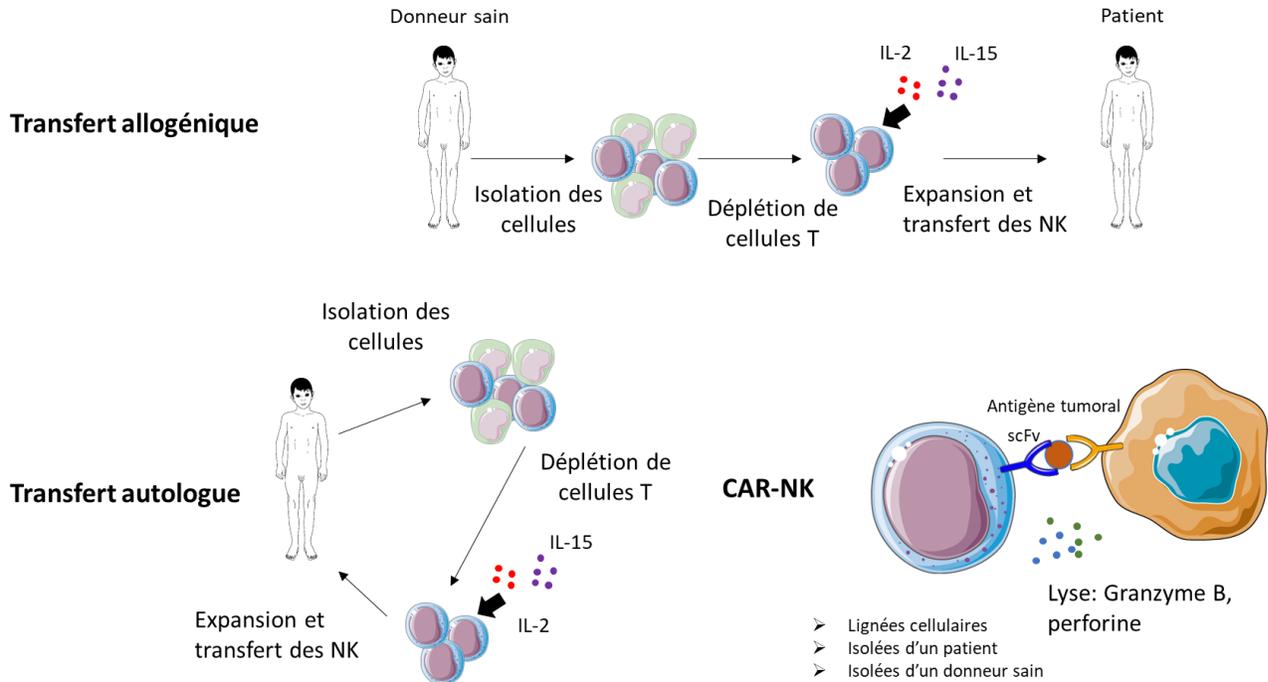


Figure 15. – **Stratégies pour augmenter l'activité des cellules NK par transfert dans le but de développer une immunothérapie dépendante des cellules NK.** Adaptée de (174). Éléments graphiques tirés de Servier Medical Art.

3.5.1 Expansion allogénique et autologue

La greffe allogénique de cellules hématopoïétiques (HCT) est l'une des options thérapeutiques les plus efficaces dans le cadre du neuroblastome (175). Les stratégies immunothérapeutiques utilisant des cellules NK transférées de manière adaptative sont particulièrement pertinentes avec la possibilité de pré-activer et de manipuler les cellules NK avant la perfusion. L'expansion *ex vivo* des NK périphériques avec des milieux contenant des cytokines telles que l'IL-2 et l'IL-15 permet d'obtenir un nombre élevé de cellules NK activées facilitant la greffe, en effet, il a été démontré que l'IL-12 favorise la libération d'IFN- γ , la migration et la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) médiée par les NK (174). Ainsi, cette stratégie peut être applicable à plusieurs types de cancer dont le neuroblastome. L'association avec la chimiothérapie a montré des résultats prometteurs chez les patients atteints de cancer du côlon (176).

3.5.2 CAR-NK

À la suite du développement des cellules CAR-T : « Chimeric Antigen Receptor » consistant à modifier génétiquement des cellules T afin qu'elles produisent un récepteur antigénique chimérique à leur surface qui les rend aptes à reconnaître et à tuer les cellules cancéreuses, certaines études se sont concentrées sur le développement de cellules NK génétiquement modifiées par CAR utilisant le sang de cordon ombilical comme source de matériel biologique (174). La plupart des études utilisant des NK conçues par CAR ont porté leur attention sur CD19 et CD20 ciblant les tumeurs malignes à cellules B (177). Une étude, portant sur le neuroblastome, s'est concentré sur l'induction de cellules NK exprimant un CAR spécifique à l'antigène GD2. Il a été montré que l'expression de celui-ci favorise la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales. L'efficacité du traitement avec des NK spécifiques de GD2 était dépendante de la reconnaissance de l'antigène et peut être inversée en utilisant des anticorps anti-GD2. L'avantage de cette thérapie est qu'en plus de tuer les cellules cibles tumorales de manière dépendante du CAR, les cellules CAR-NK possèdent toujours leur activité cytotoxique naturelle contre les cellules tumorales (174, 178). La majorité des essais cliniques actuels avec des cellules CAR-NK utilisent la lignée cellulaire NK92 en raison de sa capacité de prolifération illimitée in vitro et de sa sensibilité probablement réduite aux cycles répétés de congélation/décongélation. Cependant, des optimisations sur l'amélioration de la conception CAR pour une activation et une cytotoxicité optimale des cellules NK, sur l'infiltration des CAR-NK dans les tumeurs solides et sur la reprogrammation de ces cellules pour une surveillance tumorale à long terme sont à l'étude pour améliorer l'efficacité de ces traitements afin de développer une immunothérapie cellulaire sécuritaire et efficace contre le cancer (179).

3.5.3 Médicaments améliorant l'activité des cellules NK

Des études précliniques portant sur des dérivés de la thalidomide (un agent anti angiogéniques et immunomodulateur) démontrent que le lénalidomide et le pomalidomide peuvent améliorer indirectement la cytotoxicité des cellules NK en activant la signalisation intracellulaire de la phosphoinositide-3 kinase (PI3K). En effet, celle-ci entraîne la translocation nucléaire du facteur nucléaire des lymphocytes T activés 2 (NFAT2) et de la protéine activatrice 1 (AP-1) permettant la libération d'IL-2 et d'IFN- γ à partir des lymphocytes T et des DC. Cela favoriserait l'activité des NK

(174, 180). De plus, le lénelidomide augmente l'expression de NKG2D, de DNAM1 et de leurs ligands sur les cellules tumorales dans le cas du myélome humain (174, 181).

D'autre part, une étude *in vitro* utilisant des inhibiteurs des HDACs, dont l'acide valproïque, démontre une augmentation de MICA/B et ULBP2 sur les cellules de myélome humain en induisant la phosphorylation de ERK ½ et en favorisant ainsi leur lyse par les NKs (182).

Finalement, les inhibiteurs de point de contrôle du cycle cellulaire anti PD-1 et CT-011 efficaces dans les mélanomes, et le cancer du poumon en bloquant les protéines qui empêchent le système immunitaire (cellules T) d'attaquer les cellules cancéreuses, augmentent la sécrétion de CXCR4 et d'IFN-γ ce qui améliore l'activité des cellules NK (183, 184). De plus, le blocage de TIGIT peut prévenir l'épuisement des cellules NK et déclencher une immunité tumorale dans plusieurs modèles de souris (185). Ainsi, la combinaison des immunothérapies existantes à ces médicaments pourrait être une solution à la faible activité des cellules NK sur les cellules tumorales par sensibilisation des cellules cibles d'une part ou d'autre part par potentialisation de la balance de récepteurs sur les cellules NK.

3.5.4 Avantages comparés aux lymphocytes T

Les cellules NK sont fonctionnellement similaires aux cellules T cytotoxiques CD8 + et tuent les cellules cibles par des mécanismes cytotoxiques similaires, mais manquent d'un TCR (récepteur des cellules T) réarrangé somatiquement et spécifique de l'antigène pour reconnaître les complexes CMH-peptide du non soi (179).

Par rapport aux cellules CAR-T, les cellules NK démontrent une sécurité supérieure, et plus récemment la sécurité de l'immunothérapie cellulaire CAR-NK a été démontrée dans plusieurs contextes cliniques (179, 186). Le risque de toxicité sur cible/hors tumeur pour les tissus normaux est relativement faible en raison de la durée de vie limitée des cellules CAR-NK dans la circulation (179). De plus, plusieurs effets secondaires connus suite aux CAR-T sont diminués en clinique lors de l'utilisation des CAR-NK dont (i) le risque de maladie du greffon contre l'hôte (176); (ii) le syndrome de libération des cytokines et (iii) la neurotoxicité (187).

De plus, les cellules NK peuvent éliminer les cellules cibles de manière indépendante du CAR grâce à leur cytotoxicité naturelle et peuvent être activées par modulation de l'activité de leurs récepteurs. Ainsi, les cellules NK modifiées par CAR peuvent être capables d'éradiquer efficacement une tumeur hétérogène dans laquelle certaines cellules tumorales n'expriment pas l'antigène ciblé par CAR (179).

Ainsi, les traitements d'immunothérapies montrent une ouverture prometteuse sur l'utilisation des cellules NK avec une optimisation des découvertes actuelles dans le but de potentialiser l'activité cytotoxique de ces dernières sur les cellules tumorales.

4 – Développement d'un modèle préclinique représentatif de la tumeur *in-situ*

4.1 Limites de la culture en monocouche (modèle 2D)

Les cultures cellulaires permettent de comprendre la biologie cellulaire, les mécanismes des maladies, l'action des médicaments, la production de protéines et le développement de l'ingénierie tissulaire. Elles sont souvent utilisées dans la recherche préclinique de nombreux médicaments, dans la recherche sur le cancer et dans les études sur la fonction des gènes (188). Les avantages des cultures 2D sont associés à une maintenance simple et peu coûteuse de la culture cellulaire et à la réalisation de tests fonctionnels. Cependant, les cultures adhérentes présentent également de nombreux inconvénients. En effet, les cellules cultivées en 2D n'imitent pas les structures naturelles des tissus ou des tumeurs qui sont en 3D (188, 189). Après isolement du tissu et transfert dans les conditions 2D, la morphologie des cellules est modifiée, tout comme la vitesse de division cellulaire. La perte de phénotype spécifique est également le résultat de la culture 2D. Un autre inconvénient de celle-ci est que les cellules en monocouche se trouvent dans un microenvironnement qui est artificiel avec des niveaux d'oxygène et de nutriments très différents de niveaux tissulaires. De plus, dans le cas des cellules cancéreuses *in situ*, la disponibilité des nutriments, de l'oxygène, et des autres composantes est encore plus variable en raison de l'architecture particulière de la masse tumorale (188). Ainsi, ces différents points impactent la réponse aux médicaments ainsi qu'à l'exposition aux cellules immunitaires telles que les cellules NK, ce qui rend ce modèle moins représentatif de la tumeur *in-situ* et induisant donc plusieurs échecs lors des phases cliniques (188-191).

4.2 Développement de modèles favorisant les interactions cellulaires

Les cellules d'un tissu interagissent avec les cellules voisines et avec la matrice extracellulaire (ECM) par des signaux biochimiques et mécaniques. Les interactions cellule-cellule et cellule-ECM établissent un réseau de communication en 3D qui maintient la spécificité et l'homéostasie du

tissu. Les cultures en sphéroïdes (3D) rétablissent ces interactions physiologiques et peuvent mieux imiter la spécificité des tissus réels comparativement aux cultures en 2D conventionnelles. Elles sont actuellement utilisées dans plusieurs études de biologie cellulaire, y compris la biologie tumorale, l'adhésion cellulaire, la migration cellulaire et la morphogénèse épithéliale (189). De plus, il est maintenant reconnu que les cellules cultivées en 3D ont des niveaux d'expression génique différents par rapport au 2D. Les cellules de mélanome en 2D présentent une signature transcriptomique différente aux cellules de mélanome cultivées en 3D sous forme de sphéroïdes. Les gènes qui sont régulés positivement dans les sphéroïdes le sont également dans les tumeurs suggérant une meilleure représentation tumorale *in vitro* (192).

Dans le cas du neuroblastome, le nombre de modèles 3D *in vitro* imitant les tumeurs du neuroblastome a rapidement augmenté. Ainsi, plusieurs systèmes de cultures 3D ont été mis en place démontrant des propriétés différentes (193).

Tout d'abord, en utilisant des conditions de faible adhérence, les sphéroïdes sont obtenus par agrégation cellulaire. Ils représentent un outil pour reproduire *in vitro* les caractéristiques *in vivo* des cellules tumorales en ce qui concerne la production d'ECM, les interactions cellule-cellule, la cinétique de croissance, l'hétérogénéité cellulaire, l'activité de la voie du signal et l'expression génique (193). En effet, par exemple, de hauts niveaux de stathmine (une protéine de liaison à la tubuline) sont associés à de plus hauts risques de métastases dans le neuroblastome en contribuant à un caractère plus invasif des cellules (194). Dans le modèle 3D utilisant la propriété de faible adhérence des plaques, cette protéine ainsi que SNAI2 (facteur de transcription favorisant la migration) sont surexprimés et associés à une augmentation de la capacité invasive des cellules de neuroblastome comparativement au modèle 2D (193-195). Les limites de ce modèle sont la variabilité de la taille des sphéroïdes ainsi que leur densité hétérogène. De plus, une culture à long-terme est difficile compte tenu de la faible population de cellules souches cancéreuses en mesure d'autorenouveler le corps nécrotique se trouvant au milieu du sphéroïde (193).

Une autre méthode couramment utilisée est d'incorporer des sphéroïdes dans du Matrigel (de composition variable) donnant une valeur ajoutée à la composition du microenvironnement en

améliorant certaines caractéristiques biologiques d'une tumeur. Cette méthode permet d'obtenir un grand nombre de sphéroïdes par essai. Il est également possible de mélanger une suspension de cellules à du matrigel et de les placer dans des plaques 96 puits à fond rond. Dans ce cas, les cellules s'agrègent pour former des sphéroïdes mais manquent d'interactions cellule à cellule, entraînant des difficultés ou des retards dans la formation de sphéroïdes matures (196). De plus, dans le cas de criblage à haut débit (HTS), la composition de cette matrice extracellulaire peut influencer la réponse aux médicaments en altérant notamment la biodisponibilité locale des médicaments, l'expression des cibles médicamenteuses ou en modifiant des mécanismes de défense cellulaire intrinsèques tels que l'augmentation de la réparation des dommages à l'ADN ou l'apoptose à travers les interactions avec les cellules tumorales (196, 197). Par exemple, dans un modèle de cancer de la prostate, les dommages à l'ADN induits par le docétaxel ou la mitoxantrone ont provoqué une augmentation de l'expression du GDNF dans les cellules stromales, ce qui a favorisé la prolifération, l'invasion et la résistance des cellules tumorales de manière paracrine (198). Démontrant ainsi l'une des conséquences antitumorales de l'effet de réparation des dommages l'ADN que pourrait induire le matrigel.

Un des défis dans le modèle est de modéliser l'obtention de sphéroïdes dérivés de tumeur. Ces derniers sont générés à partir de cellules cancéreuses isolées de biopsies de patients diagnostiqués avec une maladie métastatique de stade 4. La difficulté est de prédire quel critère biologique est un facteur déterminant pour permettre la réussite de la croissance *in vitro* d'un seul échantillon qui actuellement ne présente un taux de réussite que de 55% (193, 199). Un autre modèle est celui des organoïdes tumoraux dérivés des patients. Il s'agit d'agrégats de cellules 3D dérivées *in vitro*, capables de s'auto-renouveler et de s'autoorganiser, tout en présentant la fonctionnalité attendue de l'organe. Les organoïdes sont généralement générés à partir de cellules souches embryonnaires (ECS) ou de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) (200). Ces derniers présentent de fortes ressemblances phénotypiques et génétiques avec la tumeur d'origine, permettant leur utilisation dans plusieurs domaines. Leur possible cryoconservation à long terme est un atout pour la génération de biobanques (193, 201). Cependant, la plupart des organoïdes cancéreux dérivés de patients ont une origine épithéliale. Ainsi, la génération de

cultures organoïdes à partir d'échantillons primaires de neuroblastome qui est un cancer non épithélial, reste aujourd'hui un défi (193).

4.3 Développement de modèle récapitulant les interactions paracrines

Le sécrétome englobe les protéines libérées de la surface cellulaire et les protéines intracellulaires libérées par une voie de sécrétion non classique ou des exosomes. Ces protéines sécrétées comprennent de nombreuses enzymes, facteurs de croissance, cytokines et hormones ou autres médiateurs solubles. Ils ont un rôle important dans les processus de croissance cellulaire, de différenciation, d'invasion et d'angiogenèse en régulant les interactions cellule à cellule et cellule à matrice extracellulaire (202). Dans plusieurs études, le milieu conditionné est utilisé pour étudier le sécrétome de différents types cellulaires. Celui-ci est obtenu en récoltant le milieu des cellules ayant atteints une confluence de 60 / 80% après quelques jours de culture. Ce dernier englobe les protéines excrétées par ces cellules et comprennent de nombreuses enzymes, facteurs de croissance, cytokines et hormones ou autres médiateurs solubles. Ils sont fondamentaux dans les processus de croissance, de différenciation, d'invasion et d'angiogenèse cellulaires en régulant les interactions cellulaires (203). Ainsi, la mise en culture avec le surnageant d'un type cellulaire agit sur le comportement physiologique de la population étudiée permettant ainsi d'analyser l'effet du sécrétome entre différents types cellulaires (204). Les variabilités retrouvées dans les milieux conditionnés sont dues au type de milieu de culture basal, aux types cellulaires cultivés, aux conditions oxydatives, à la dimensionnalité de la culture cellulaire et à l'utilisation de sérum bovin fœtal (FBS) (205). Il a été démontré que dans le cas des cellules souches, les cultures en sphéroïdes donnent une concentration de protéines plus élevée que les cultures de cellules souches monocouches et créent un profil de cytokines plus pertinent sur le plan physiologique (205, 206). Finalement, la caractérisation de milieu conditionné peut se faire de différente manière : par analyse d'ELISA, par spectrométrie de masse (LC-MS), par chromatographie. L'utilisation de milieu conditionné pour la culture d'une autre lignée cellulaire est utilisée pour modéliser un certain microenvironnement (205). Dans le cas du neuroblastome, une étude a démontré que le milieu conditionné provenant de cellules de neuroblastome

contenait de l'IL-6 et du TGF β 1, ce qui supprime l'activité cytotoxique des cellules NK et ainsi modélise l'évasion immunitaire dans un contexte *in vitro* (207).

4.4 Criblage à haut débit (HTS) et découverte de médicaments

Le criblage de médicaments pour tester plusieurs médicaments candidats ou des bibliothèques de composés est une méthode pour découvrir de nouveaux traitements potentiels. Pour obtenir un seul médicament approuvé, des dizaines de milliers de composés sont généralement soumis à plusieurs étapes de sélection avant les essais cliniques (208-210). Même après le long et coûteux processus d'identification des composés principaux et de génération de dérivés optimisés, environ 80 % des médicaments échouent lors des essais cliniques. En effet, le taux de réussite des nouveaux médicaments en essais cliniques de phase I à III est seulement de : 13,8 %, toutes études confondues. En oncologie, il est seulement de 3,4% alors qu'il atteint près de 20,9% pour les autres maladies (210).

Un système de criblage de médicaments comprend trois composants principaux : les composés ou médicaments à cribler, les protocoles de criblage et les cellules cibles ou modèle à cribler. Ces dernières années, le repositionnement de médicaments est privilégié. Il s'agit d'utiliser des médicaments précédemment approuvés ou abandonnés pour de nouvelles indications thérapeutiques. Le repositionnement permet d'économiser du temps et de l'argent dans le développement de nouvelles thérapies (210, 211). En effet, les médicaments approuvés ont déjà subi toutes les phases d'essais cliniques afin d'atteindre le marché et ont ainsi un profil d'innocuité connu et accepté. Si une nouvelle indication clinique pour un médicament approuvé est suggérée, ce médicament peut réintégrer le processus d'essai clinique en phase II, réduisant ainsi considérablement le risque, le temps et les coûts (212).

Ainsi, les modèles *in vitro* actuels du neuroblastome ne sont pas récapitulatifs de la tumeur chez les patients. Un des défis est de développer un ou des modèles permettant de mieux mimer la tumeur *in situ* permettant de reconstituer les caractéristiques du développement tumoral dont la perte de surveillance immunitaire. Le modèle en sphéroïdes pourrait avoir une caractérisation plus similaire des conditions *in vivo* que le modèle en monocouche par le gain d'interactions

cellulaires. L'établissement d'un modèle plus représentatif augmentera les chances de développer un nouveau traitement qui pourrait passer les phases cliniques grâce à la meilleure représentabilité des essais précliniques.

Hypothèse et objectifs

Le système de culture en monocouche (2D) n'est pas récapitulatif des caractéristiques d'une tumeur *in-situ* chez le patient, notamment de la notion de résistance à l'activité cytotoxique des cellules NK.

Hypothèse : La co-culture de cellules de neuroblastome en présence de cellules NK-92 dans un modèle de culture en 3D induit des changements transcriptionnels et épigénétiques se rapprochant d'une tumeur *in situ*.

Objectifs :

- 1) Tout d'abord, nous allons établir et caractériser un modèle de culture de cellules de neuroblastome en sphéroïde dans le temps : analyse de la croissance cellulaire, des changements phénotypiques des cellules ainsi que l'expression des gènes. Les expériences seront réalisées sur trois lignées de neuroblastome (SK-N-AS, IMR-32 et IGR-N91).
- 2) À l'aide de ces données un système de coculture sera mis en place en utilisant des cellules NK92 : mise au point des conditions favorables (temps de culture en sphéroïdes, ratios, type de coculture) récapitulant la notion de résistance immunitaire.
- 3) Des expériences de milieux conditionnés seront effectuées pour découvrir une potentielle inhibition de l'activité cytotoxique des cellules NK92 par la sécrétion de différents facteurs des cellules SK-N-AS en 2D et en 3D : investigation de la cause de la faible activité des cellules NK dans le neuroblastome et évaluation du sécrétome du modèle 3D dans ce contexte d'immunorésistance.
- 4) Finalement, un crible de 181 composés épigénétiques sera effectué sur les cellules SK-N-AS en monoculture et en coculture (avec les NK), en conditions 2D et en 3D : identification des composés potentialisant l'activité des NK sur les cellules en 3D.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Culture cellulaire en monocouche :

Neuroblastome : 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 ATCC. Ces lignées ont été cultivées dans du DMEM, EMEM et DMEM (Wisent Bioproducts) respectivement avec une supplémentation de 10% en FBS (sérum fœtal de bœuf-Wisent Bioproducts). Les cellules sont cultivées dans des flasques à surface adhérente (Corning). Lorsque 80% de confluence est atteint, les cellules sont lavées au PBS 1X (Phosphate-Buffered Saline) puis détachées de leur surface avec de la trypsine 0,25% (Gibco), incubée 5min, 37°C. La trypsine est ensuite inactivée avec le milieu complété, respectif à chaque lignée. La densité cellulaire est déterminée par compte avec du bleu de Trypan et les cellules sont remises en culture à la concentration appropriée.

Cellules NK : La lignée de cellules NK-92 a été achetée (CRL-2407) chez ATCC et cultivée dans du RPMI (Wisent Bioproducts) supplémenté avec 20% de FBS et 100UI/mL d'IL-2 recombinant humain (Peprotech, 200-02). La densité cellulaire à chaque passage est de 200 000 cellules/mL et les cellules ont été centrifugées à 1000rpm/min aux deux jours. La culture a été effectuée dans des flasques à suspension.

Leucémie : La lignée leucémique K562 a été cultivée dans du RPMI supplémenté à 10% de FBS et à une densité cellulaire de 80 000 cellules/mL à chaque passage aux deux jours avec une centrifugation à 1000rpm/min. La culture a été effectuée dans des flasques à suspension (Corning).

Les différentes lignées cellulaires ont été placées dans un incubateur humidifié avec 5% de CO₂ à 37 °C.

Cultures cellulaires en sphéroïdes :

Après trypsinisation, les cellules de neuroblastome provenant de culture en 2D, sont réparties à la concentration de 20 000 cellules / puits, dans des plaques 96 puits en forme de U à faible

adhésion (Ultra-low Attachment Plate, de S-BIO (MS-9096UZ). Les cellules s'agrègent en sphéroïdes au fond du puits après centrifugation à 1000rpm/min. Les IGR-N91 ont été cultivées dans du DMEM/F12K 1 :1 supplémenté à 10% de FBS différemment du 2D; les types de milieu des autres lignées ont été conservés. Le passage des sphéroïdes a été effectué aux jours 3, 10, 17, 24 et 31 après leur ensemencement en 3D. À chaque passage, les cellules sont ramenées à leur concentration initiale de 20 000 cellules / puits.

Temps de doublement, viabilité cellulaire et taille des cellules :

Taille cellulaire : À chaque passage cellulaire, la taille des cellules a été déterminées en utilisant le compteur à cellule ORFLO MOXI Mini Automated Cell Counter.

Temps de doublement : Le temps de doublement a été calculé selon la formule suivante : $(t_1 - t_0) \times \ln(2) / \ln(N_{t1}/N_{t0})$ où t_0 est le temps de début de culture (h) ; t_1 est le temps de fin de culture (h) ; N_{t0} est le nombre de cellules au t_0 et N_{t1} est le nombre de cellules au t_1 .

Viabilité cellulaire : La viabilité cellulaire a été mesurée par cytométrie en flux. Pour cela, les cellules provenant de sphéroïdes ou de monoculture, en plaque 96 puits, ont été dissociées avec de la trypsine comme décrit précédemment. Cette dernière est inactivée par l'ajout du milieu de culture de chaque puits (contenant les débris et les cellules mortes en suspension) collectés en amont. 25 μ l de réactif Viacount (Luminex, 4000-0040) a été ajouté par puits. Après une incubation de 5 min à température ambiante, dans l'obscurité, la viabilité cellulaire a été analysée avec le cytomètre en flux Guava (Millipore) et le logiciel d'analyse GuavaSoft. Un puits contrôle contenant des cellules mortes, chauffées 10min à 95°C, a été utilisé pour placer correctement les fenêtres d'acquisition en identifiant les cellules mortes.

Imagerie de suivi microscopique des cellules et calcul de l'aire des sphéroïdes :

Les sphéroïdes en plaques 96 puits sont photographiés avec l'IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System (compagnie). Les images ont été prises aux 3 heures, ce qui permet de prendre des images périodiquement lors de l'incubation des cellules avec un objectif de 4X, pour toutes les conditions de mono et de coculture avec marquage au CFSE (ester succinimidyle de carboxyfluorescéine). Les données d'aire du sphéroïde ont aussi été calculées à partir du logiciel IncuCyte.

Marquage au CFSE :

Les cellules NK92 ont été centrifugées puis récoltées dans du PBS à 1 million de cellules par mL. Un ajout d'1 μ L de CFSE à une concentration de 40 μ M a été effectuée par million de cellules avec une incubation de 20min à 37°C dans l'obscurité. Du milieu de culture RPMI à 20% de FBS a été ajouté à un volume correspondant à 5 fois celui du PBS suivi d'une incubation de 10min à 37°C dans l'obscurité. Finalement, une dernière centrifugation à 1000rpm/5 minutes et une incubation finale de 10min dans le milieu de culture RPMI sont réalisées avant l'utilisation des cellules.

Milieus conditionnés de neuroblastome :

Le milieu conditionné des cellules SK-N-AS a été récolté après 3 jours de culture sans changement pour la condition 2D ou au jours 24 de culture en 3D, soit 7 jours après le dernier passage cellulaire. Le jour 3 en 2D représente un temps de culture à confluence cellulaire et est utilisé dans la littérature (213). Le jour 7 en 3D représente le temps de passage et le milieu est conservé plus longtemps du au ralentissement de la croissance cellulaire dans le modèle en sphéroïdes. Les cellules NK92 exposées au milieu conditionné, ont été cultivées avec un milieu composé de 50% de RPMI (contenant 10% de FBS) et 50% de milieu conditionné.

Co-culture par agrégat mixte et par couche stratifiée :

Avant d'être ajoutées aux cellules de neuroblastome, les cellules NK92 ont été marquées au CFSE. Pour les expériences de coculture en 2D, les NK92 ont été ajoutées directement dans les cultures de cellules de neuroblastome.

Concernant la coculture en 3D, les sphéroïdes de neuroblastome au jour 24 de culture, ont tout d'abord été trypsinisés comme précédemment décrit. Ensuite les cellules NK92 ont été ajoutées : (i) à la suspension cellulaire puis centrifugées dans les plaques 96 puits ULA, de manière à ce qu'elles intègrent le sphéroïde lors de sa formation; ou (ii) 48h après la reformation du sphéroïde.

Les NK92 ont été ajoutées aux ratios de : 1 :5 ; 1 :1 ; 2 :1 comparativement aux cellules de neuroblastome. Les expériences ont été faites dans 50% DMEM (milieu des cellules de neuroblastome) et 50% RPMI (milieu de culture des NK92).

Analyse de cytotoxicité :

Les analyses de cytotoxicité ont été faites au Guava avec l'ajout d'iodure de propidium à une concentration finale de 2µg/mL et avec une incubation de 5min à température ambiante. Les calculs ont été faits en utilisant la population de cellules non marquées au CFSE (SK-N-AS) et en normalisant le total de cette population à 100%. Le pourcentage de cellules mortes de cette population a ensuite été déduit à la moyenne des puits contrôles.

Cycle cellulaire :

Environ 2 millions de cellules de neuroblastomes ont été collectées, rincées au PBS, puis incubées avec de l'éthanol froid 100%, au moins une nuit à -20°C. Après un rinçage au PBS, le culot cellulaire est incubé avec 1µL/mL de RNase A (ThermoFisher, 2031592) pendant 20min à 37°C. Ensuite, 1µg/mL d'iodure de propidium (PI) (Sigma, P4170) est ajouté afin de marquer l'ADN. L'analyse est effectuée par cytométrie en flux (Guava, Millipore) afin d'évaluer le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire, grâce à des pics de fluorescence dans le filtre RED-B.

Expression protéique et analyse des histones par immunobuvardage de type

Western Blot :

Après récolte, les cellules ont été lysées sur glace pendant 30 min dans du tampon de lyse (50 mM Tris-Cl pH 7,4 ; 5 mM EDTA ; 250 mM NaCl ; 50 mM NaF ; 0,1% Triton X100 ; 0,1 mM orthovanadate de sodium (Na₃VO₄) et 1 mM PMSF), complété par les cocktails d'inhibiteurs de protéase (PIC)(Sigma-Aldrich) et d'inhibiteurs de phosphatase (PhosphoSTOP)(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. La concentration des échantillons a été déterminée par dosage au Bradford 25% (compagnie) et lue par absorbance. Les échantillons protéiques ont été équilibrés à la même concentration par l'ajout de tampon de lyse et de laemmli 5X.

D'autre part dans le cas des extractions d'histones, les culots cellulaires ont été lysés dans du TEB froid (0,5% Triton ; 2 mM PMSF ; 0,02% NaN₃ ; 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 Western Blots ont été réalisés en suivant le protocole de Bio-Rad.

Les anticorps primaires utilisés ont été reconstitués selon les concentrations définies (Tableau 3) et incubés avec les membranes PVDF (Bio-Rad) dans du TBS- tween- (composition) lait à 5% à 4°C toute la nuit. Les anticorps secondaires : Goat Anti-Mouse (IgG (H+L) -HRP Conjugate, #1706516, Bio-Rad), Goat Anti-Rabbit (IgG (H+L) -HRP Conjugate, #1706515, Bio-Rad), Goat Anti-Rat (IgG : HRP, #STAR72, Bio-Rad) et Donkey Anti-Goat (IgG H/L : HRP, #642005, Bio-Rad) ont été utilisés à une concentration de 1/10 000 dans du TBS-T lait à 5% et incubé pendant 2 heures à température pièce avec la présence des membranes.

Les protéines ont été visualisées avec la solution Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) en utilisant l'imagerie au système ImageQuant LAS 4000. La quantification des bandes a été réalisée à l'aide d'ImageJ. Les quantifications ont été normalisées par rapport à l'actine et à la condition 2D.

Protéine	Compagnie/ Numéro de catalogue	Anticorps secondaire	Dilution
PHOX2B	ABCAM/ ab183741	Anti-Rabbit	1/1000
SUZ12	ActiveMotif/ 39057	Anti-Rabbit	1/1000
EED	ActiveMotif/ 61204	Anti-Mouse	1/1000
RUNX2	ABCAM/ ab23961	Anti-Rabbit	1/1000
HAND2	ABCAM/ ab200040	Anti-Rabbit	1/1000
Caspase 8	ABCAM/ ab32397	Anti-Rabbit	1/1000
DR5	RDsystems/ MAB6313	Anti-Mouse	1/1000

Vinculine	Cell Signaling/ 13901	Anti-Rabbit	1/500
Vimentine	Sigma-Aldrich/ V6630	Anti-Mouse	1/1000
CD112	MyBiosource/ MBS8242085	Anti-Rabbit	1/1000
CD155	MyBiosource/ MBS9401179	Anti-Rabbit	1/1000
ULBP1	RDsystems/ AF1380	Anti-Goat	1/500
ULBP2	ABCAM/ ab275023	Anti-Rabbit	1/1000
ULBP3	ABCAM/ ab259988	Anti-Rabbit	1/1000
MICA/B	CellSignaling/ 64899S	Anti-Rabbit	1/500
HLA-E	Proteintech/ 66530-1	Anti-Mouse	1/1000
DNAM1	RDsystems/ MAB666	Anti-Mouse	1/1000
NKG2D	RDsystems/ MAB1547	Anti-Rat	1/1000
Actine	Sigma-Aldrich/ A2228	Anti-Mouse	1/500

Tableau 3. – Listes des anticorps primaires ainsi que leur concentration utilisée dans les expériences d'expression protéiques.

Histone	Compagnie/ Numéro de catalogue	Anticorps secondaires	Dilution
H3	ActiveMotif/ 39763	Anti-Mouse	1/5000
H3K9ac	ActiveMotif/ 39917	Anti-Rabbit	1/5000
H3K27ac	ActiveMotif/ 39134	Anti-Rabbit	1/5000

H3ac	ActiveMotif/ 39139	Anti-Rabbit	1/5000
H3K27me1	ActiveMotif/ 39889	Anti-Rabbit	1/5000
H3K27me2	ActiveMotif/ 61435	Anti-Mouse	1/5000
H3K27me3	ActiveMotif/ 39155	Anti-Rabbit	1/5000
H3K9me1	ActiveMotif/ 39887	Anti-Rabbit	1/5000
H3K9me2	ActiveMotif/ 39753	Anti-Rabbit	1/5000
H3K9me3	ActiveMotif/ 39765	Anti-Rabbit	1/5000
H3R2me2a (asymétrique)	ABCAM/ ab194706	Anti-Rabbit	1/5000

Tableau 4. – Listes des anticorps primaires ainsi que leur concentration utilisée dans les expériences d’expression des marques d’acétylation et de méthylation sur l’histone H3.

Coupes des sphéroïdes et fixation des cellules :

Coupe et fixation des sphéroïdes : Les sphéroïdes ont été fixés pendant 1 heure avec du paraformaldéhyde (PFA) 4% puis placés dans de l’OCT après une brève coloration à l’éosine (combien de %). Les sphéroïdes sont stockés à -80°C. Des sections de 20um d’épaisseur ont été effectuées avec un Cryotome puis conservées sur lame polarisées à -80°C.

Fixation des cellules en monocouche : Après trypsinisation, 130 000 cellules ont été fixées sur des lames de microscopie par centrifugation (Cytospin), 1000rpm, 7min. Les cellules sont ensuite fixées à la PFA 4%, 1h puis rincées au PBS avant d’être conservées à -80°C ou marquées pour l’immunofluorescence.

Immunofluorescence :

Les échantillons sont sortis du congélateur 1 heure avant d’effectuer l’immunofluorescence. Les lames sont bloquées 1 heure avec du PBS à 1%FBS. Les anticorps primaires (Tableau 3) sont ensuite ajoutés selon leur concentration :1/250 pour CD155 et HLA-E dans du PBS à 1%FBS pour

une incubation d'une nuit à 4°C. Après incubation, les lames sont rincées 3 fois avec du PBS. Finalement, les anticorps secondaires adéquats sont incubés : AlexaFluor 555 goat anti-mouse IgG (H+L) (ThermoFisher, A21422) ou AlexaFluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Thermofisher, A11008) à une concentration de 1/1000 pendant 1 heure. Après incubation, les lames sont lavées 3 fois au PBS puis déshydratées dans des bains d'éthanol 70% et 100%. Les cellules sont marquées au DAPI (ThermoFisher, P36962) (2 gouttes par mL) pendant 10min. Les lames sont ensuite séchées et montée avec 50uL de milieu de montage Prolong Gold.

Les échantillons ont été photographiés avec un microscope à fluorescence inversée DMI8, objectif 10X. Les images sont traitées avec le logiciel LAS X.

Extraction et séquençage d'ARN :

Les lysats cellulaires ont été homogénéisés grâce à QIAshredder (numéro de catalogue: 79654). L'ARN total a ensuite 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.

Les analyses de données ont été effectuées avec l'aide d'Étienne Caron, un stagiaire du laboratoire du Dr Serge Mcgraw sur le logiciel GenPipes rna-seq pour l'alignement des gènes. Les données ont été ensuite analysées sur EdgeR pour normaliser les comptes et générer les log2foldchange. Cet outil a aussi servi à calculer la valeur de P et le taux de fausses découvertes (FDR ou P value adjusted) selon la méthode Benjamini-Hochberg. Les différentes figures ont été générées par ggplot2, Complexheatmap et EnhancedVolcano en utilisant l'expression des gènes significativement modulés ($p < 0.05$) ainsi qu'une valeur du log2foldchange inférieur à -1 et supérieur à 1. De plus, l'analyse de voies d'expression sur et sous-exprimées a été effectuée sur le logiciel Metascape avec les gènes préalablement sélectionnés. Et finalement, les "gene set enrichment analysis" (GSEA) ont été générés par la version Windows du programme GSEA.

Criblage de médicaments :

Les analyses de cytotoxicité ont été faites au Guava avec l'ajout d'iodure de propidium à une concentration finale de 2µg/mL et avec une incubation de 5min à température ambiante. Durant le passage à la trypsine, les milieux ont été collectés puis ajoutés aux cellules avant l'ajout de PI. Les calculs ont été faits en utilisant la population de cellules non marquées au CFSE (SK-N-AS) et en normalisant le total de cette population à 100%. Le pourcentage de cellules vivantes de cette population dans les puits traités avec des composés épigénétiques ont ensuite été normalisés aux puits contrôles en co-culture et traités au DMSO (Sigma- Aldrich) ou à l'eau selon le calcul suivant : $(\text{viabilité du composé} \times 100) / \text{viabilité moyenne des puits contrôles}$. 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 DMSO à 100%. Les composés épigénétiques ont été conservés à -80 °C.

Cellules en monocouche : En 2D, les cellules SK-N-AS ont étéensemencées à 10 000 cellules par puits dans des plaques Sarstedt à fond plat puis traitées 24 heures après avec 181 composés de la librairie épigénétique SelleckChem (Epigenetics Compound Library (96-well) -Z203065-100 µL1900) à 10µM. L'ajout des cellules NK92 marquées au CFSE a été effectué 24 heures après le traitement des cellules à un ratios de 1 :1. Ainsi, la concentration des composés passe à 5µM durant les dernières 24h avec l'ajout du milieu des cellules NK92. L'utilisation d'une pipette automatisée à 96 puits Integra a permis la trypsinisation de tous les puits de la plaque. Finalement, les plaques ont été passées au Guava pour l'évaluation des viabilités des cellules SK-N-AS 24 heures après l'ajout des cellules NK92.

Sphéroïdes : En 3D, après le passage cellulaire au jours 24, les cellules SK-N-AS ont été traitées 24 heures après dans les mêmes conditions que les cellules en 2D avec l'ajout des cellules NK92 au même ratio 24 heures après le traitement des plaques. Et, finalement, les plaques ont été passées au Guava pour l'évaluation des viabilités des cellules SK-N-AS 24 heures après l'ajout des cellules NK92.

Analyses statistiques :

Les statistiques et graphiques ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Le test de comparaison multiple de Tukey (ANOVA à un ou deux facteurs) a été utilisé pour l'analyse a statistique avec une valeur de $p < 0.05$ considérée comme valeur significative.

Chapitre 3 : Résultats

Caractérisation des modèles de sphéroïdes de trois différentes lignées de neuroblastome :

L'utilisation de plusieurs lignées cellulaires de neuroblastome est justifiée du fait que ces lignées diffèrent par l'amplification de *MYCN*. En effet, la seule lignée où *MYCN* est non amplifiée est celle des SK-N-AS. De plus, le sexe, l'âge des patients ainsi que l'origine des cellules diffèrent afin d'avoir un certain degré de diversité dans notre échantillonnage. En effet, les IMR-32 proviennent d'une métastase abdominale d'un garçon de 13 mois, les SK-N-AS proviennent d'une métastase de la moelle osseuse d'une fille de 6 ans et les IGR-N91 proviennent d'une métastase de la moelle osseuse d'un neuroblastome au stade 4 d'un garçon de 8 ans selon l'ATCC.

Afin d'établir une culture en 3D de cellules de neuroblastome, les lignées SK-N-AS, IMR-32 et IGR-N91 ont étéensemencées à 20 000 cellules par puits dans une plaque à 96 puits à ultra faible adhésion, suivi d'une centrifugation de 1000rpm durant 5min. Le premier passage 3 jours après cet ensemencement permet d'éliminer les cellules mortes générées lors du passage en sphéroïdes durant la phase d'adaptation (**Fig. 1A**). Afin, d'établir un modèle de culture en 3D à long terme, les cellules sont trypsinisées et réensemencées à 20 000 cellules par puits tous les 7 jours et ces différents temps de passage représentent des moments où nous ferons la caractérisation de la croissance cellulaire, la compaction, ainsi que l'expression protéique (**Fig. 1A**). Après la centrifugation de 5min lors du passage en sphéroïde, une compaction significative de l'aire des sphéroïdes est observée durant les 24 premières heures. En effet, la valeur de l'aire pour toutes les lignées passe d'environ $2.5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ à $0.25 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ 24 heures après leur passage dans des plaques à faible adhérence (**Fig. 1B-C**). Grâce à l'imagerie par l'Incucyte S3, une croissance cellulaire, mesurée par l'augmentation du diamètre des sphéroïdes est constatée après les 24 premières heures de culture en 3D pour la lignée IGR-N91 (**Fig. 1B-C**). La taille cellulaire diminue légèrement mais de façon non significative durant les 31 jours de culture en sphéroïdes. Le diamètre des cellules des lignées SK-N-AS et IMR-32 diminue d'environ 2 à $4 \mu\text{m}$ alors que dans le cas des IGR-N91, leur diamètre varie légèrement lors de la culture en 3D (**Fig. 1D**). Ainsi, l'absence de changements significatifs de la taille des cellules ne permet d'expliquer la

réduction du diamètre des sphéroïdes. Ce dernier pourrait être expliqué par la formation de jonctions adhérentes entre les cellules en 3D et de nouveaux réseaux de communication formant une compaction des cellules entre elles avec un changement morphologique de ces dernières entraînant une réduction du diamètre des sphéroïdes. D'autre part, les analyses de croissance cellulaire ont été effectuées par le calcul du temps de doublement aux différents temps de culture en 3D. Dans le cas des 3 lignées de neuroblastome, on observe un ralentissement du taux de division cellulaire en 3D par rapport en 2D. Tout d'abord, on observe une phase d'adaptation durant les 10 premiers jours de culture en 3D marquée par une augmentation significative du temps de doublement passant de 37h à 120h pour les SK-N-AS, de 20h à 140h pour les IMR-32 et de 57h à 100h pour les IGR-N91. Par la suite, une phase de maintenance et d'équilibre est observée par le maintien d'un plateau avec une croissance cellulaire qui ne varie que très peu (**Fig. 1F**).

Concernant la viabilité cellulaire en 3D, nous avons mesuré, dans le cas de la lignée SK-N-AS, une baisse de viabilité jusqu'au jour 10 pouvant traduire une élimination des cellules qui ne peuvent pas s'adapter à la culture en 3D. La lignée IMR-32 conserve une viabilité aux alentours de 90% malgré la mise en culture en 3D pouvant être expliquée du fait qu'en culture en monocouche, ces cellules semblent avoir la capacité de former des « grappes » de cellules viables en suspension se traduisant par une meilleure capacité à pousser en 3D. Enfin, la viabilité de la lignée IGR-91 en 3D varie de manière non significative selon les temps de culture. On suppose que cela est due à l'élimination des cellules mortes qui ne s'adaptent pas à la culture 3D mais qu'ensuite, le corps nécrotique dense de ces sphéroïdes est responsable de l'accumulation de cellules mortes durant les prochains temps de culture ce qui affecte la viabilité générale du sphéroïde (**Fig. 1E**). Finalement des expériences de cycle cellulaire ont été effectuées en 2D et en 3D à différents temps de culture. Dans le cas des SK-N-AS, au jour 3, une augmentation significative des cellules apoptotiques est notable, passant à un pourcentage d'environ 40%, possiblement due à la présence des cellules non adaptées à la culture 3D. Au jour 31, une présence de cellules apoptotiques est aussi notable marquant une limite pour la culture à long terme de cette lignée. Au niveau de la croissance cellulaire, les proportions de cellules en phases G2/M et S sont plus grande en 2D tandis que dans la culture 3D se sont les phases G0/G1 qui comportent le plus de

cellules. Parallèlement aux données de viabilité, la lignée IMR-32 présente une faible présence de cellules apoptotiques durant tout le processus de culture en sphéroïdes. Finalement, dans le cas des IGR-N91, on observe l'augmentation significative de la proportion de cellules apoptotiques à différents jours de culture 3D, principalement aux jours 3 et 10. D'autre part, une diminution des phases de croissance cellulaire G2/M et S est constatée démontrant un ralentissement de cette lignée en culture 3D (**Fig. 1G**).

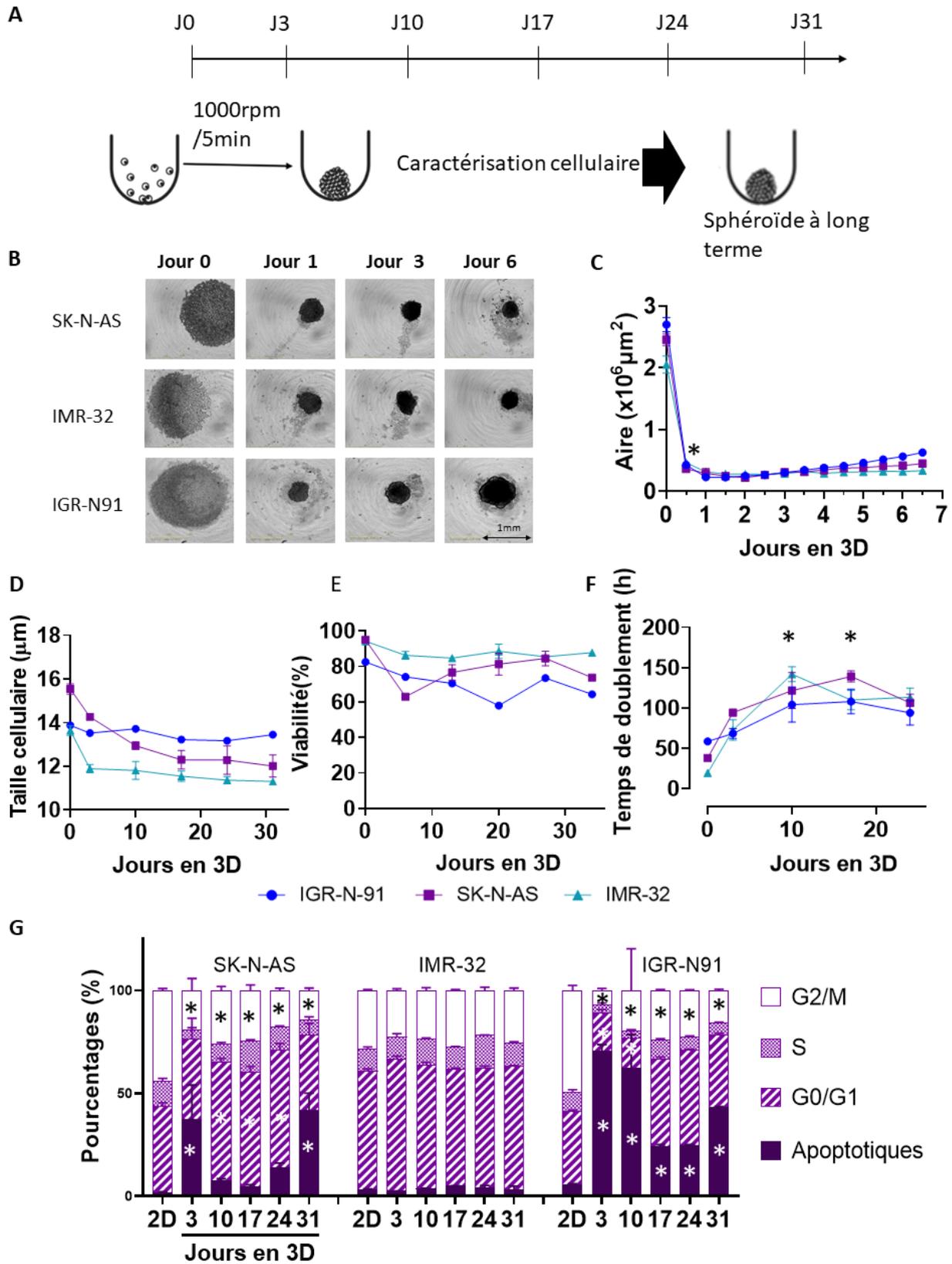


Figure 1. Caractérisation des modèles de sphéroïdes des lignées de neuroblastome SK-N-AS, IMR-32 et IGR-N91. **A.** Schéma descriptif du passage en culture 3D et de la caractérisation cellulaire à différents temps de culture. **B.** Images à l'Incucyte S3 Live-Cell Analysis System à un grossissement 4X des sphéroïdes durant les 7 premiers jours de culture en 3D. **C.** Aire de la compaction des sphéroïdes mesurée toutes les 12 heures pendant 6 jours de culture en 3D. **D.** Mesure du diamètre cellulaire par Incucyte S3 Live-Cell Analysis System pendant 31 jours de culture 3D. **E.** Viabilité cellulaire des sphéroïdes mesurée par cytométrie en flux. **F.** Temps de doublement mesurés pendant 24 jours de culture en 3D. **G.** Analyse du cycle cellulaire mesurée par cytométrie en flux à tous les temps de caractérisation cellulaire pendant 31 jours en 3D. La condition 2D est comparée aux différents jours en 3D. Pour l'ensemble des données la moyenne \pm SEM, N=3 est calculée, *: $p < 0.05$ pour les trois lignées de neuroblastome obtenu par Anova à deux facteurs avec le test de comparaison multiple de Tukey). Les temps de cultures en 3D sont comparés au 2D.

Caractérisation de l'expression protéique dans le modèle 3D de différents types de marqueurs dans les lignées SK-N-AS, IMR-32 et IGR-N91 :

Une récolte des cellules des trois lignées a été effectuée en 2D ainsi qu'à différents temps de culture en 3D équivalent à ceux utilisés dans les expériences de caractérisation cellulaire. Une analyse protéique par Western Blot ainsi qu'une quantification des bandes a été effectuée. Dans le cas des facteurs de transcription du circuit régulateur RUNX2 ainsi que les membres du complexe PRC2 : SUZ12 et EED ne montrent aucun changement d'expression significatif entre la culture 3D et 2D dans nos trois lignées (l'expression de EED n'a pas été détectée dans les lignées IMR-32 et IGR-N91). Cependant, le facteur de transcription HAND2 est significativement plus exprimé avec un facteur de 3 dans les lignées SK-N-AS et IMR-32 à partir du jours 17 en 3D comparativement au 2D et est significativement sous exprimé au jours 31 dans la lignée IGR-N91. Finalement le facteur de transcription PHOX2B n'est significativement pas dérégulé lors du passage en 3D dans les lignées SK-N-AS et IMR-32 mais est significativement surexprimé au jours 31 des sphéroïdes de la lignée IGR-N91 (**Fig. 2A, 3A, 4A**). Les marqueurs apoptotiques comme la caspase 8 ainsi que le récepteur DR5 (TRAIL-R) sont exprimés seulement dans la lignée SK-N-AS mais ils ne sont pas significativement dérégulés lors du passage en 3D (**Fig. 2B**). Finalement les

marqueurs de la matrice extracellulaire dont la vimentine et la vinculine ne démontrent aucun changement d'expression significatif dans les différentes lignées (**Fig. 2C, 3B, 4B**).

Finalement, le but de ces expériences, a été de déterminer à quel temps de culture en 3D les cellules varient le plus comparativement à la culture 2D dans le but de mieux mimer la tumeur *in-situ*. À l'aide de ces résultats, les lignées SK-N-AS et IMR-32 ont été choisies à 24 jours de culture. En effet, à partir du jours 17 plusieurs changements ont été observés et sont conservés au jours 24 où les cellules se retrouvent dans la phase d'équilibre d'un point de vue viabilité, temps de doublement et taille cellulaire. Le jours 31 est caractérisé par une tendance à la baisse de la viabilité cellulaire et une augmentation des débris observables au microscope indiquant une limite de la culture 3D à long terme avec une difficulté d'utiliser des cellules débutant à ce jour de culture comme modèle de culture dans la suite de nos expériences. De plus, l'augmentation significative d'expression de HAND2 démontre un changement dans le circuit régulateur de la transcription de ces lignées de neuroblastome à partir du jours 17. Cette augmentation n'a pas été observée dans la lignée IGR-N91. Aussi, les changements non significatifs d'expression des gènes entre le modèle 2D et 3D ainsi que l'augmentation de la proportion de cellules apoptotiques lors du passage en 3D nous ont permis d'éliminer cette lignée cellulaire pour la suite de nos expériences.

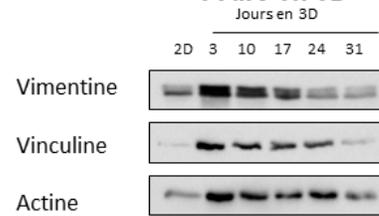
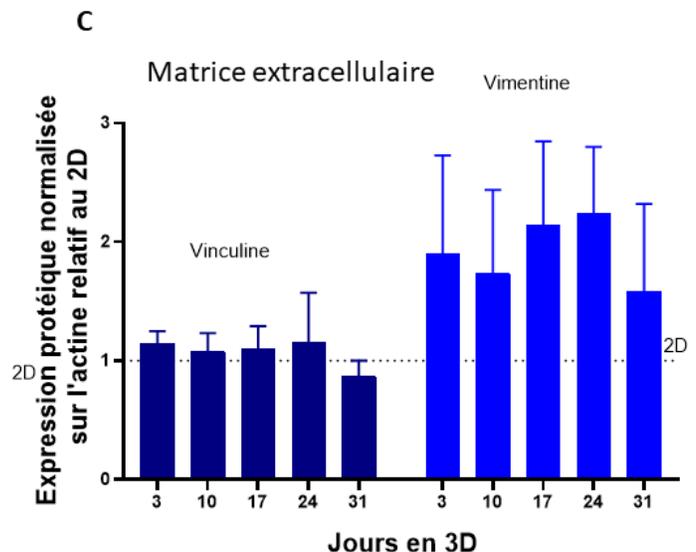
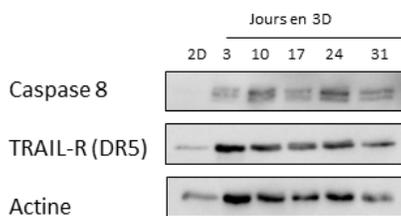
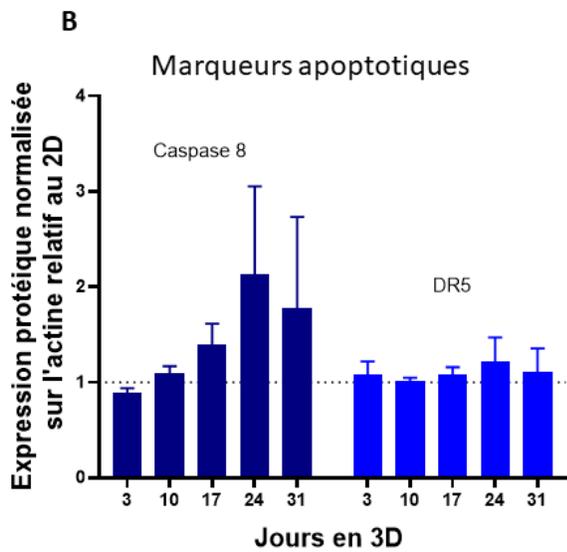
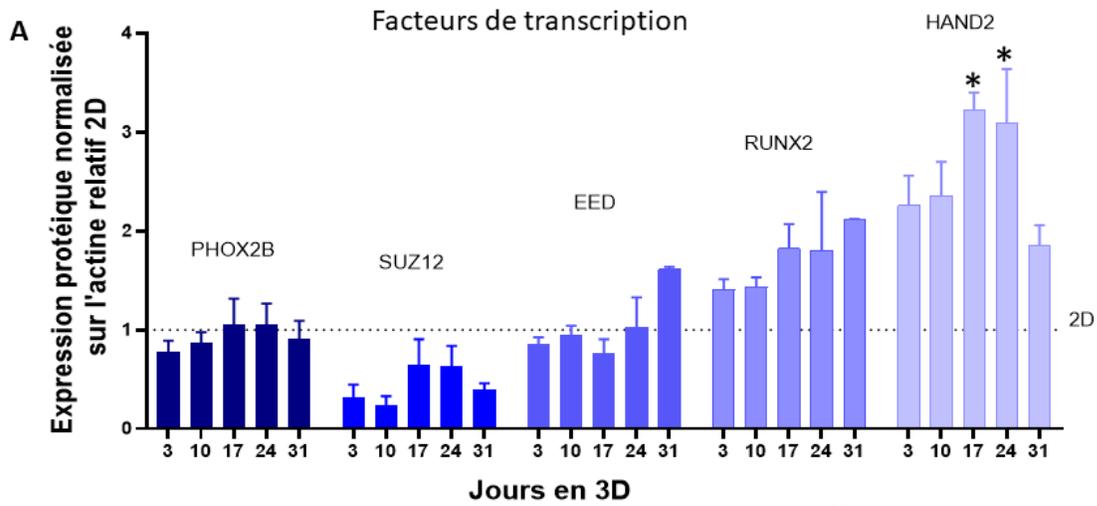


Figure 2. Caractérisation de l'expression protéique de plusieurs marqueurs de la lignée SK-N-AS en fonction du temps de culture en sphéroïdes. A. Western Blot et quantification de l'expression normalisée sur l'actine et relatif à la culture 2D des facteurs de transcription PHOX2B, SUZ12, EED, RUNX2 et HAND2 dérégulés dans le neuroblastome, en fonction du temps de culture en sphéroïdes. **B.** Western Blot et quantification de l'expression normalisée sur l'actine et relatif à la culture 2D des marqueurs apoptotiques DR5 et caspase 8 dérégulés dans le neuroblastome, en fonction du temps de culture en sphéroïdes. **C.** Western Blot et quantification de l'expression normalisée sur l'actine et relatif à la culture 2D des marqueurs de la matrice extracellulaire vimentine et vinculine, en fonction du temps de culture en sphéroïdes (moyenne \pm SEM, N=3, *: $p < 0.05$ obtenu par Anova à deux facteurs avec le test de comparaison multiple de Tukey).

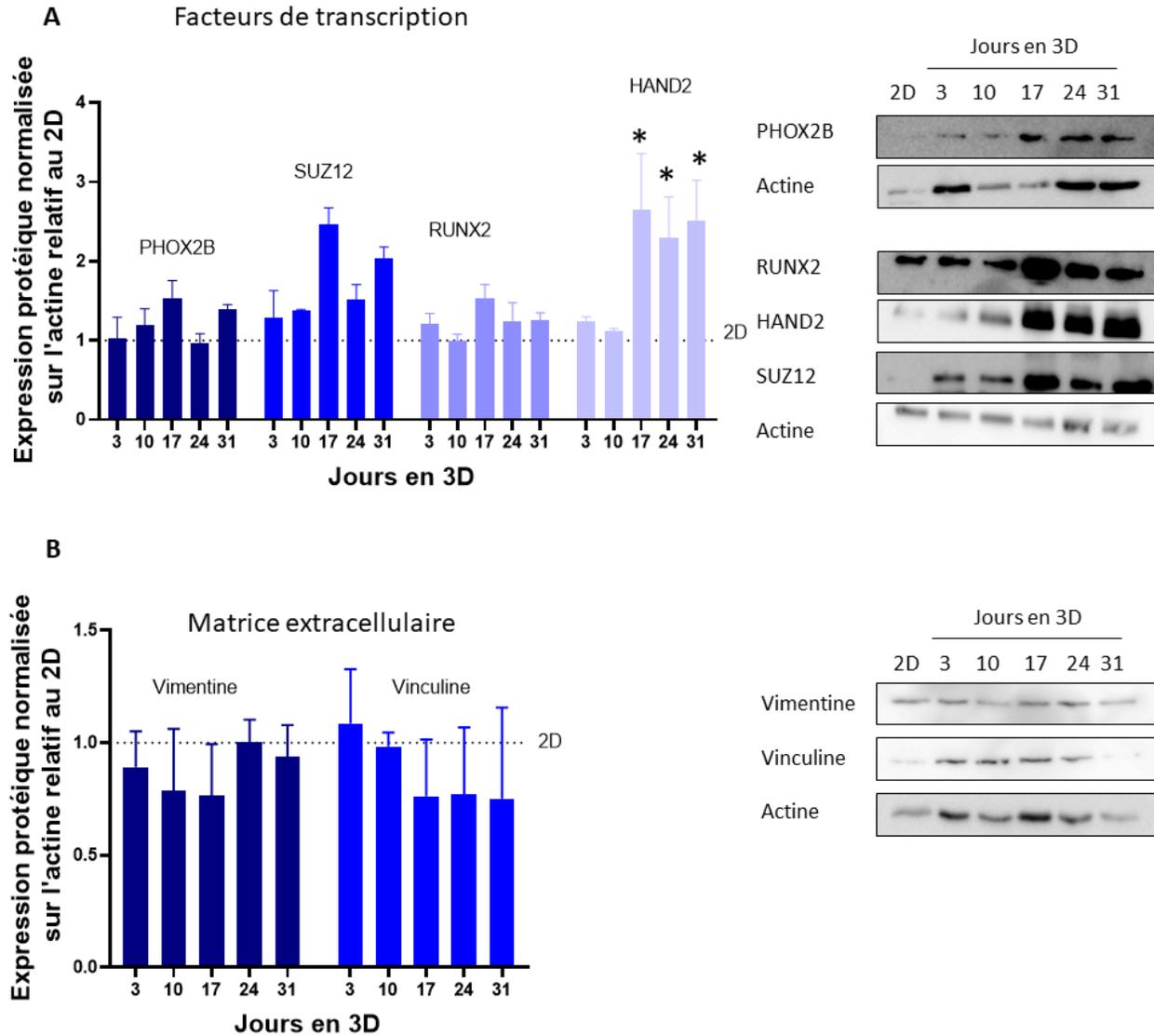


Figure 3. Caractérisation de l'expression protéique de plusieurs marqueurs de la lignée IMR-32 en fonction du temps de culture en sphéroïdes. A. Western Blot et quantification de l'expression normalisée sur l'actine et relatif à la culture 2D des facteurs de transcription PHOX2B, SUZ12, RUNX2 et HAND2 dérégulés dans le neuroblastome, en fonction du temps de culture en sphéroïdes. **B.** Western Blot et quantification de l'expression normalisée sur l'actine et relatif à la culture 2D des marqueurs de la matrice extracellulaire vimentine et vinculine, en fonction du temps de culture en sphéroïdes (moyenne \pm SEM, N=3, *: $p < 0.05$ obtenu par Anova à deux facteurs avec le test de comparaison multiple de Tukey).

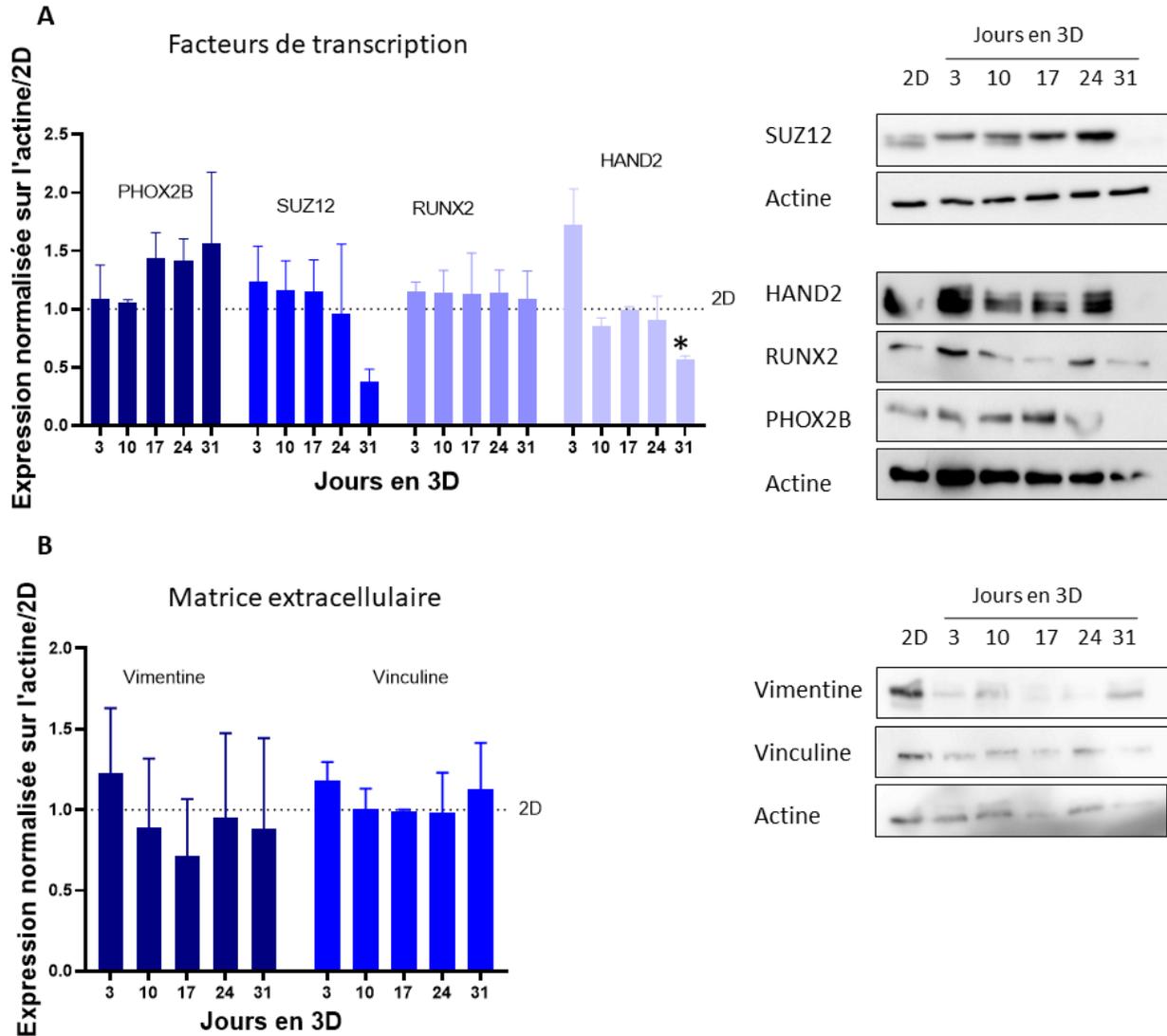


Figure 4. Caractérisation de l'expression protéique de plusieurs marqueurs de la lignée IGR-N91 en fonction du temps de culture en sphéroïdes. A. Western Blot et quantification de l'expression normalisée sur l'actine et relatif à la culture 2D des facteurs de transcription PHOX2B, SUZ12, RUNX2 et HAND2 dérégulés dans le neuroblastome, en fonction du temps de culture en sphéroïdes. **B.** Western Blot et quantification de l'expression normalisée sur l'actine et relatif à la culture 2D des marqueurs de la matrice extracellulaire vimentine et vinculine, en fonction du temps de culture en sphéroïdes (moyenne \pm SEM, N=3, *: $p < 0.05$ obtenu par Anova à deux facteurs avec le test de comparaison multiple de Tukey).

Analyse de l'expression des gènes dans les lignées SK-N-AS et IMR-32 dans le modèle 2D comparativement au modèle 3D au jours 24 :

Après avoir choisi les modèles de culture 3D au jours 24 pour les lignées SK-N-AS et IMR-32, un séquençage d'ARN à différents temps de culture en 3D ainsi qu'en 2D a été effectué pour une analyse différentielle d'expression des gènes. Sur un total de 8215 (SK-N-AS) et 7570 (IMR-32) variables, on retrouve en utilisant une valeur de p inférieure à 0,05 comme seuil de significativité ($N=3$), 3216 et de 1373 gènes différentiellement exprimés ($\log_2FC > 1$; $\log_2FC < -1$) dans les lignées SK-N-AS et IMR-32s respectivement (**Fig. 5A, 6A**). Grâce à une analyse en composante principale, une forte similarité des échantillons en 3D au jours 24 a été observée dans les deux lignées démontrant une faible variation d'expression des gènes entre les différentes expériences de culture 3D jusqu'au jours 24. Ainsi, les résultats d'expression des gènes semblent être reproductible dans ce type de culture (**Fig. 5B, 6B**). En utilisant Metascape, un logiciel d'analyse de listes de gènes, des résultats de voies d'expressions ont été générés en appliquant des normes de \log_2 foldchange supérieur à 1 pour les gènes surexprimés et inférieur à -1 pour les gènes sous exprimés dans les deux lignées (**Fig 5C, 5D, 6C, 6D**).

1902 gènes significativement surexprimés dans la lignée SK-N-AS en 3D au jours 24 appartiennent à plusieurs voies d'expression intéressantes. Notamment, les voies de la régulation de la sécrétion, du transport d'ions, de la réponse inflammatoire, de la chimiotaxie, du transport membranaire et de l'interaction de récepteurs aux cytokines confirment nos observations (**Fig. 1**) d'une augmentation d'interactions cellulaires favorisant la communication entre cellules telle que l'on retrouve dans une masse tumorale chez le patient. Les voies associées au développement neuronal tels que le développement du système nerveux autonome et la régulation du développement des projections neuronales indiquent un changement biologique dans la différenciation des cellules neuronales entre le modèle 2D et 3D. Finalement, les voies de la réponse inflammatoire et de l'interaction aux cytokines indiquent une variation dans la sensibilité à la réponse immunitaire des cellules de neuroblastome (**Fig. 5C**). D'autre part, 1314 gènes significativement sous exprimés appartiennent principalement aux voies d'expressions de l'organisation de la matrice extracellulaire, de l'adhésion cellulaire, de l'adhésion entre cellules, dans la voie de l'intégrine 1 et dans l'assemblage du collagène et d'autres structures

multimériques ce qui va à l'encontre de nos hypothèses selon lesquelles les cellules forment plus d'ECM en sphéroïdes. Cependant, la diminution de l'adhésion cellules corrèle avec le phénotype migratoire des cellules cancéreuses et donc avec le développement de métastases. De plus, les voies de développement cellulaire ainsi que la réponse au facteur de croissance sont inhibées démontrant les changements constatés dans le ralentissement de la croissance cellulaire (**Fig. 5D**).

Dans le cas des IMR-32, 779 gènes sont surexprimés et impliqués dans les voies de l'adhésion cellulaire, du transport d'ions et de la sécrétion de protéines. Celles associées au développement neuronal tels que la signalisation synaptique, le système neuronal, et le transport de neurotransmetteurs sont aussi surexprimés. Et finalement, la voie hypoxique est surexprimée. On suppose que cette voie provient des cellules formant le centre hypoxique du sphéroïde qui n'établit pas de connexion avec l'oxygène du milieu (**Fig. 6C**). Finalement, les 594 gènes sous exprimés démontrent aussi un changement au niveau des interactions cellulaires, du développement neuronal ainsi qu'à la réponse aux faibles niveaux d'oxygène démontrant l'adaptation cellulaire à de faibles niveaux d'oxygènes (**Fig. 6D**).

À la suite de ces analyses, les gènes différentiellement exprimés dans chaque lignée ont été sélectionnés puis triés en utilisant seulement ceux qui sont conjointement dérégulés dans les deux lignées. Un total de 167 gènes surexprimés et 97 gènes sous exprimés ont été identifiés et représentés sous la forme d'un diagramme de Venn (**Fig. 7A**). Les voies des interactions cellulaires, du développement neuronal et de l'hypoxie sont retrouvées conjointement dans les deux lignées marquant des changements principaux à ces niveaux lors du passage en 3D dans ces deux lignées de neuroblastome (**Fig. 7B-C**). L'ensemble de ces données nous amènent à conclure, que les caractéristiques de jonctions cellulaires, de matrice extracellulaire d'interactions cellulaires sont dérégulées ce qui est en lien à la compaction des sphéroïdes et de leur réorganisation spatiale. Les caractéristiques biologiques du développement neuronal indiquent aussi un changement dans la réponse à la différenciation cellulaire et au développement cellulaire différent dans le modèle 3D supportant l'idée d'un possible remodelage au niveau épigénétique et une différence des propriétés liées à la résistance aux cellules immunitaires.

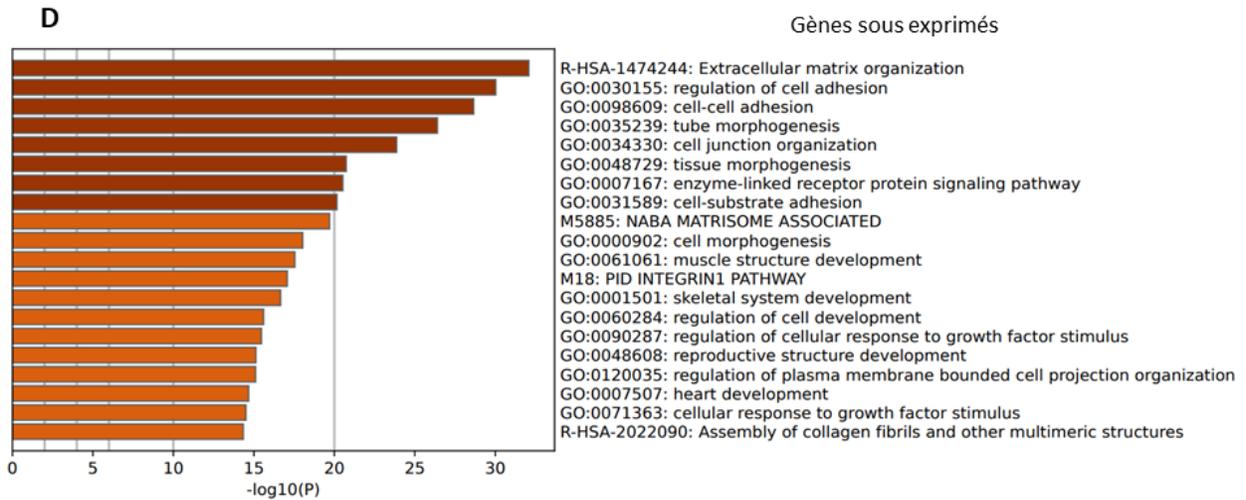
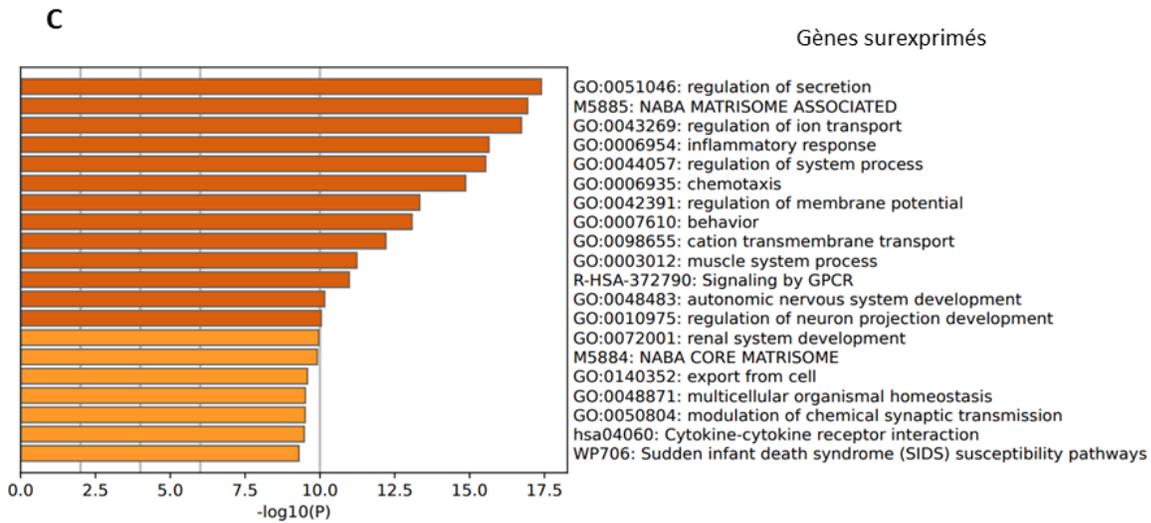
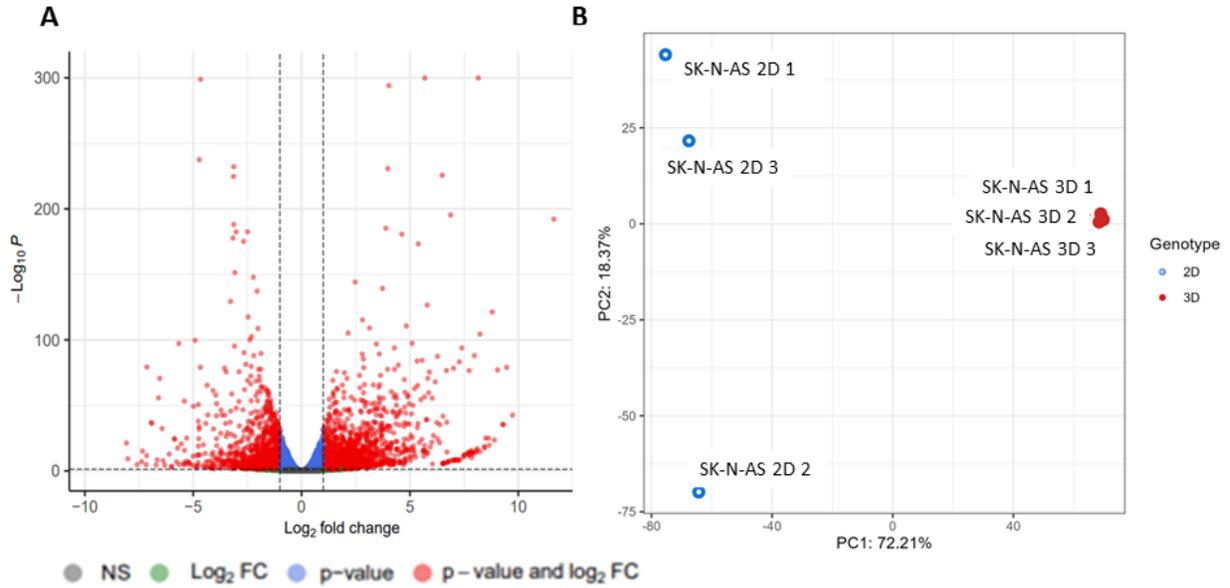


Figure 5. Analyse différentielle du profil d'expression génique de la lignée SK-N-AS en 2D comparativement au 3D après 24 jours de culture. **A.** Diagramme en volcan illustrant la surexpression et la sous expression de 8215 gènes avec une valeur de $p < 0.05$ pour un total de 20806 gènes. NS : non significatif, Log₂FC : Log₂FC significatif, p-value : p-value significative, p-value and Log₂FC : p-value et Log₂FC significatifs. **B.** Analyse en composante principale (PCA) indiquant la corrélation des gènes des différents réplicats des échantillons utilisés: SK-N-AS 2D (n=3) et SK-N-AS 3D à 24 jours (n=3). **C.** Principales voies d'expression sur les 1902 gènes significativement surexprimés avec un log₂foldchange > 1. **D.** Principales voies d'expressions sur les 1314 gènes significativement sous exprimés avec un log₂foldchange < -1.

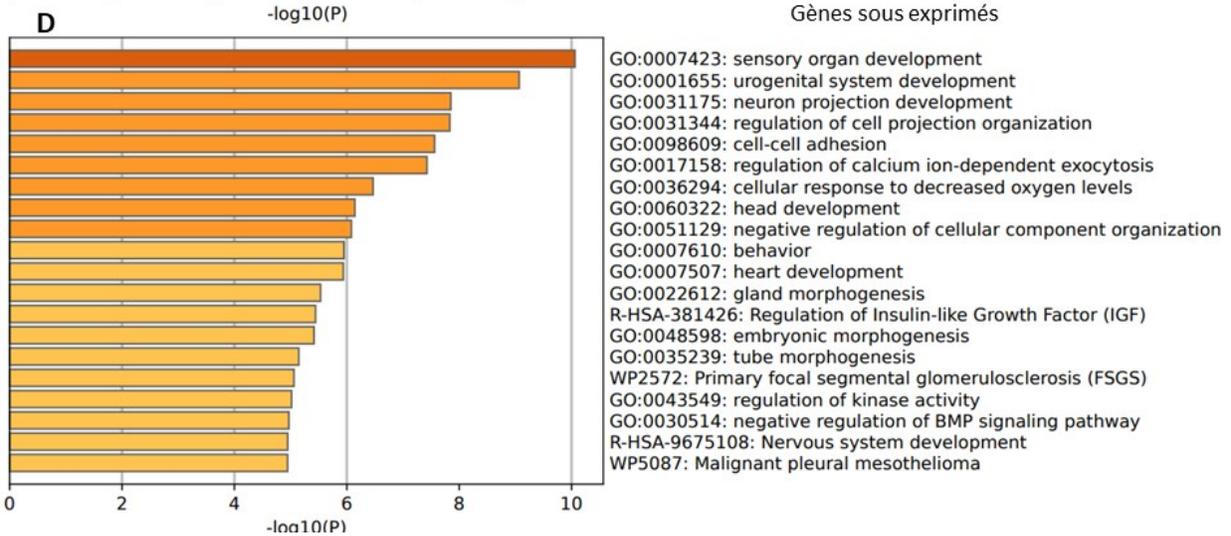
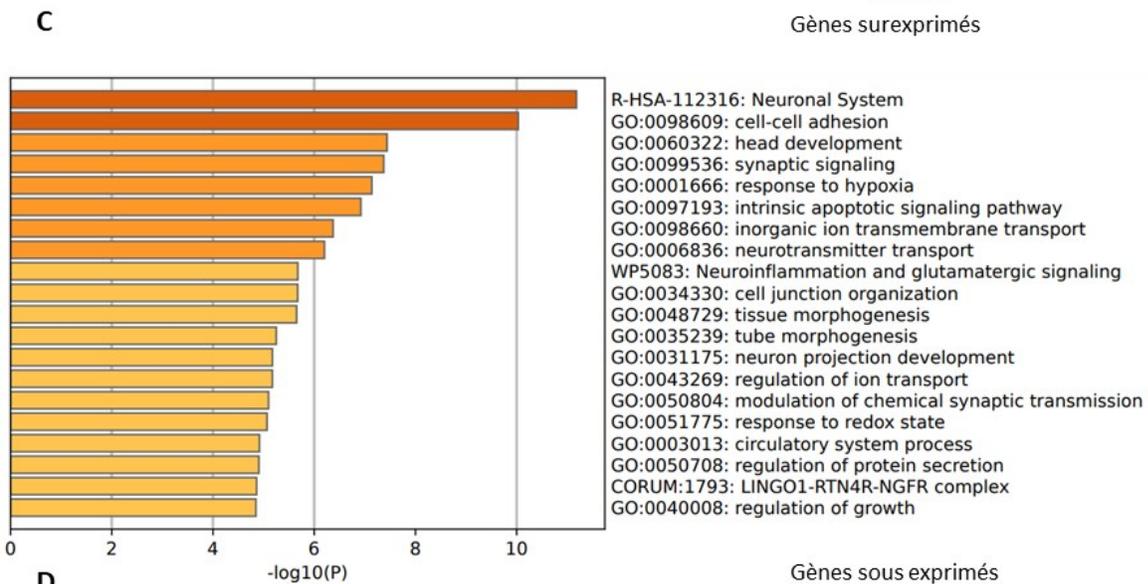
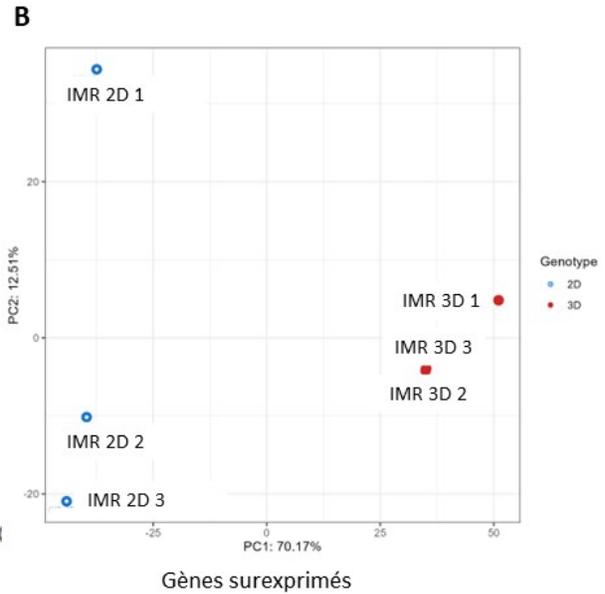
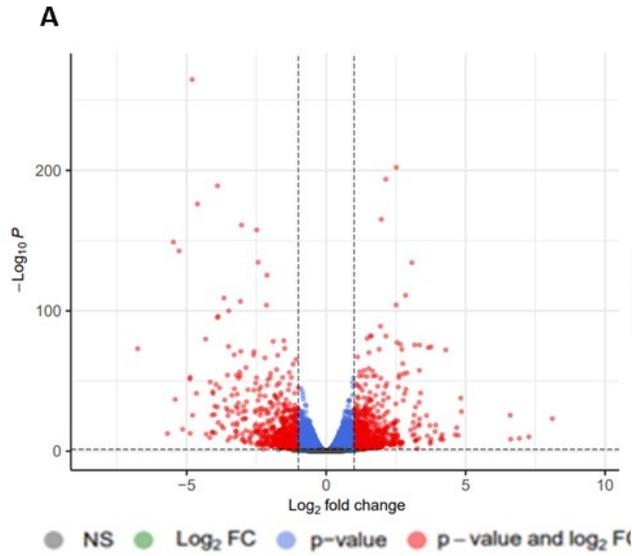


Figure 6. Analyse différentielle du profil d'expression génique de la lignée IMR-32 en 2D comparativement au 3D à 24 jours de culture. A. Diagramme en volcan illustrant la surexpression et la sous expression de 7570 gènes avec une valeur de $p < 0.05$ pour un total de 18629 gènes. NS : non significatif, Log_2FC : Log_2FC significatif, p-value : p-value significative, p-value and Log_2FC : p-value et Log_2FC significatifs. **B.** Analyse en composante principale (PCA) indiquant la corrélation des différents réplicas des échantillons utilisés: IMR-32 2D (n=3) et IMR-32 3D à 24 jours (n=3). **C.** Principales voies d'expression sur les 779 gènes significativement surexprimés avec un $\text{log}_2\text{foldchange} > 1$. **D.** Principales voies d'expressions sur les 594 gènes significativement sous exprimés avec un $\text{log}_2\text{foldchange} < -1$.

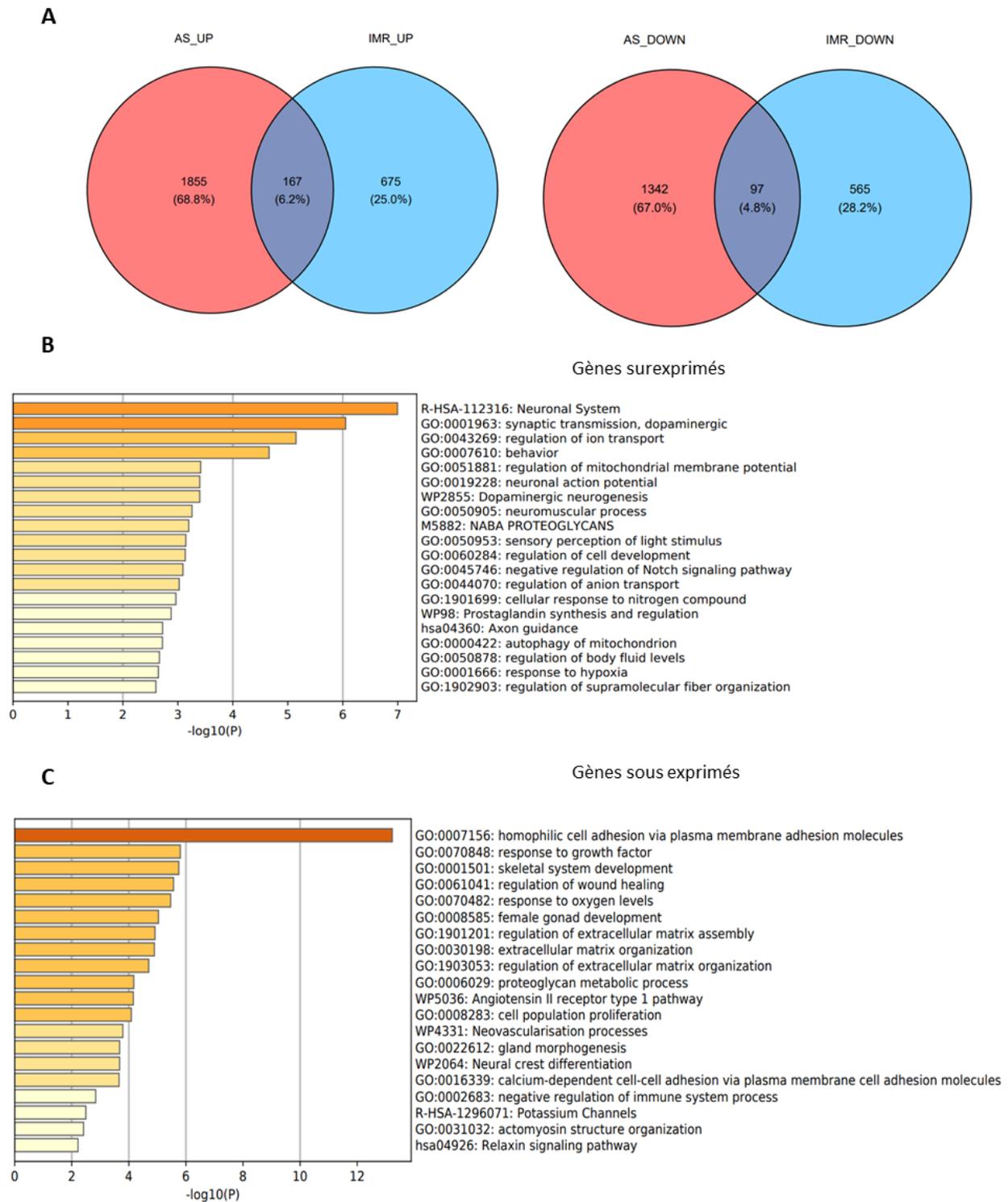


Figure 7. Analyse différentielle entre la culture 2D et 3D au jours 24 des gènes différentiellement exprimés dans les lignées SK-N-AS et IMR-32. A. Similarité des gènes

surexprimés et sous exprimés en 3D dans les deux lignées SK-N-AS et IMR-32 représentés sous la forme d'un diagramme de Venn. **B.** Principales voies d'expressions sur les 167 gènes significativement surexprimés conjointement dans les deux lignées avec un $\log_2\text{foldchange} > 1$. **C.** Principales voies d'expressions sur les 97 gènes significativement sous exprimés conjointement dans les deux lignées avec un $\log_2\text{foldchange} < -1$.

Analyse différentielle en 2D et en 3D au jours 24 du profil d'expression des gènes biologiques liés au développement des cellules de neuroblastome et du changement épigénétique au niveau de l'ADN et des histones dans les lignées SK-N-AS et IMR-32 :

Une analyse des données de séquençage a permis d'établir un heatmap pour chaque lignée cellulaire présentant l'expression des gènes sélectionnés dans chaque échantillon en 2D et en 3D afin d'identifier les voies principalement dérégulées dans le but d'orienter le projet de recherche et le choix des voies à cibler durant les différentes expériences. Les facteurs de transcription formant le circuit régulateur du neuroblastome : *RUNX3*, *HAND2*, *GATA3*, *PHOX2B* et *ISL1* sont surexprimés tandis que *RUNX2* et *RUNX1* sont sous exprimés en 3D au jours 24 dans la lignée SK-N-AS. D'autre part, *GATA2* et *HAND2* sont surexprimés et *ISL1*, *GATA3* et *RUNX2* sont sous exprimés en 3D au jours 24 dans la lignée IMR-32 (**Fig. 8A**). Plusieurs gènes jouant un rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse (*COL1A1*, *ZEB1*, *TWIST2*, *MMP2*), le cycle cellulaire (*SOX12*, *CCNB1*, *PK2M*), le métabolisme (*ENO1*, *PKM*, *LDHA*, *PGK1*) et le développement neuronal (*CARTPT*, *TH*, *DBH*, *ISM1*, *CHGB*) sont soit surexprimés soit sous exprimés de façon significative dans les deux lignées en 3D indiquant un changement global dans les propriétés cellulaires lors du passage à la culture en sphéroïdes (**Fig. 8A-B**).

En second lieu, un heatmap pour chaque lignée illustrant les niveaux d'expression des gènes jouant un rôle dans les changements épigénétiques dont la méthylation et l'acétylation a été généré en utilisant une valeur de $p < 0.05$ et un $\log_2\text{foldchange}$ inférieur et supérieur à 0.5 à partir d'une liste de gènes épigénétiques étudiés sur ces analyses différentielle (**Fig. 1, annexe**). Plusieurs régulateurs sont surexprimés dans la tumeur *in situ* et l'objectif de cette analyse a été d'identifier lesquels seraient aussi surexprimés en 3D afin de possiblement orienter le choix de composés à tester sur le modèle en sphéroïdes (**Fig. 9-B**). Pour la lignée SK-N-AS, plusieurs gènes

sont surexprimés dont *HDAC9*, *HDAC5*, *DNMT3A*, *DNMT3B* et d'autre part, plusieurs gènes sous exprimés dont *KAT2B*, *PRDM9*, *DNMT1*, *KMT2B* (**Fig 9A**). Pour la lignée IMR-32, les gènes surexprimés comprennent *HDAC9*, *HDAC10*, *HDAC11*, *KDM3A* et les gènes sous exprimés comprennent *KAT2B*, *PRMT8*, *SMARCA2*, *PRDM1* (**Fig 9B**). Ainsi, une dérégulation épigénétique sur plusieurs gènes est observée. Certains gènes suivent les niveaux d'expression retrouvés dans les tumeurs comme *HDAC9*, *HDAC10*, *DNMT3*, et *KMT2B* (149, 214, 215).

Par la suite, sachant que les marques d'acétylation et de méthylation sur l'histone H3 sont globalement reliées à des changements d'expression des gènes et aux régulateurs épigénétiques mentionnées plus-haut nous avons réalisés une étude sur les modifications post-traductionnelles des histones (**Fig. 9A-B**). Les différents temps de culture en 3D ont été utilisés comme condition ainsi que le contrôle 2D comme valeur de référence. Les niveaux des modifications des histones H3K27me3, H3K9me3, H3K27ac et H2K9ac ont été mesurées dans la lignée SK-N-AS mais aucun changement notable n'a été observé (n=2). Dans le cas des IMR32, les niveaux d'expression des histones H3K27me1, H3K27me2, H3K27me3, H3K9me1, H3K9me2, H3K9me3, H3K9ac, H3K27ac, H3R2me2 et H3ac ont été mesurés (n=3). Aucune différence significative n'a été identifiée à travers le temps de culture en 3D comparativement à la culture 2D. Ainsi, les résultats ne montrent aucune corrélation entre la variation globale de certaines modifications de l'histone H3 lors de la culture en 3D (**Fig 10A-B**).

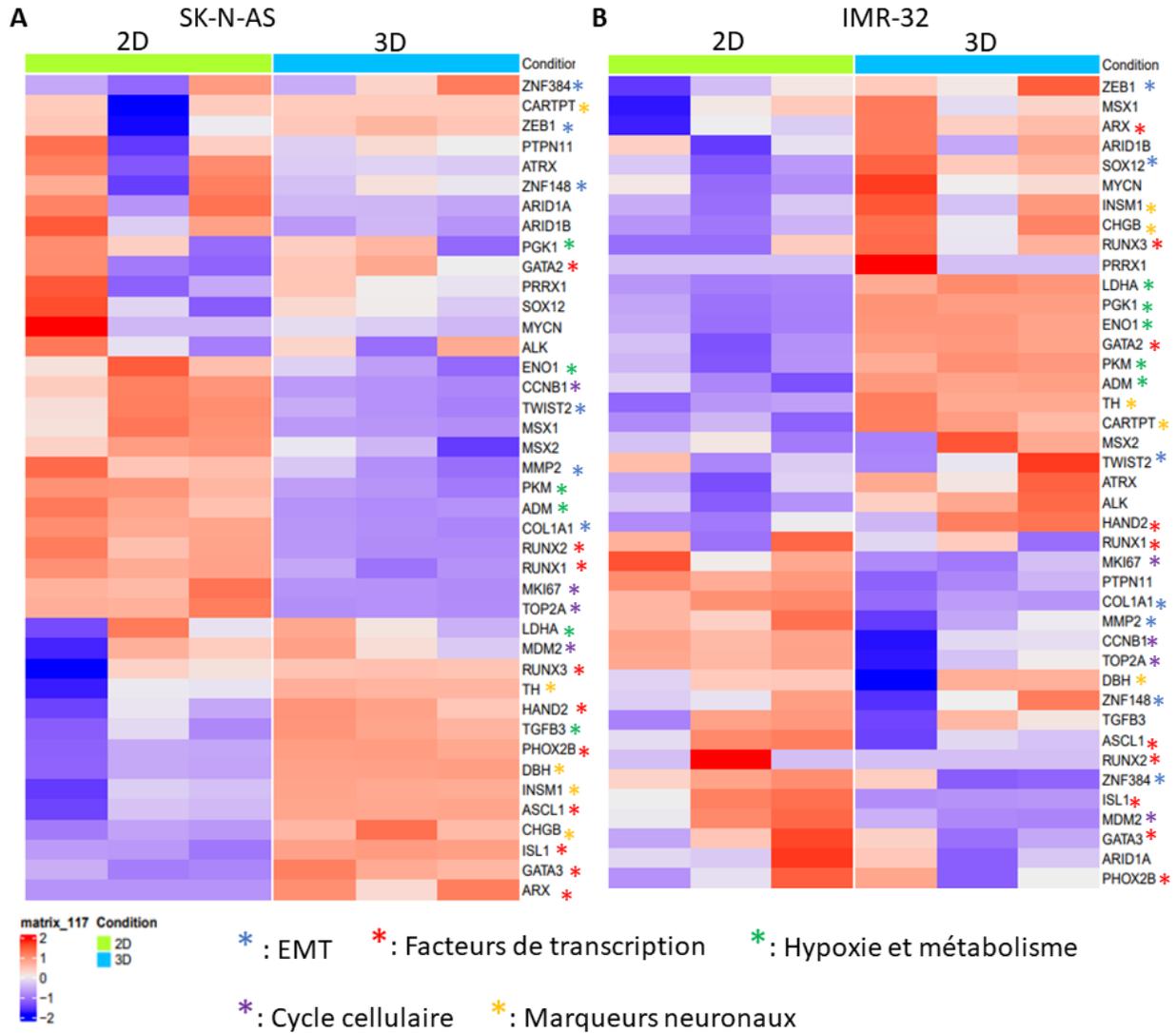


Figure 8. Analyse différentielle du profil d'expression de plusieurs gènes liés au développement et à la différenciation des cellules de la crête neurale dans les lignées de neuroblastome SK-N-AS et IMR-32 en 2D comparativement au 3D à 24 jours de culture. A. Heatmap de l'expression différentielle des gènes entre le 2D et le 3D à 24 jours de culture dans la lignée SK-N-AS. **B.** Heatmap de l'expression différentielle des gènes entre le 2D et le 3D à 24 jours de culture dans la lignée IMR-32.

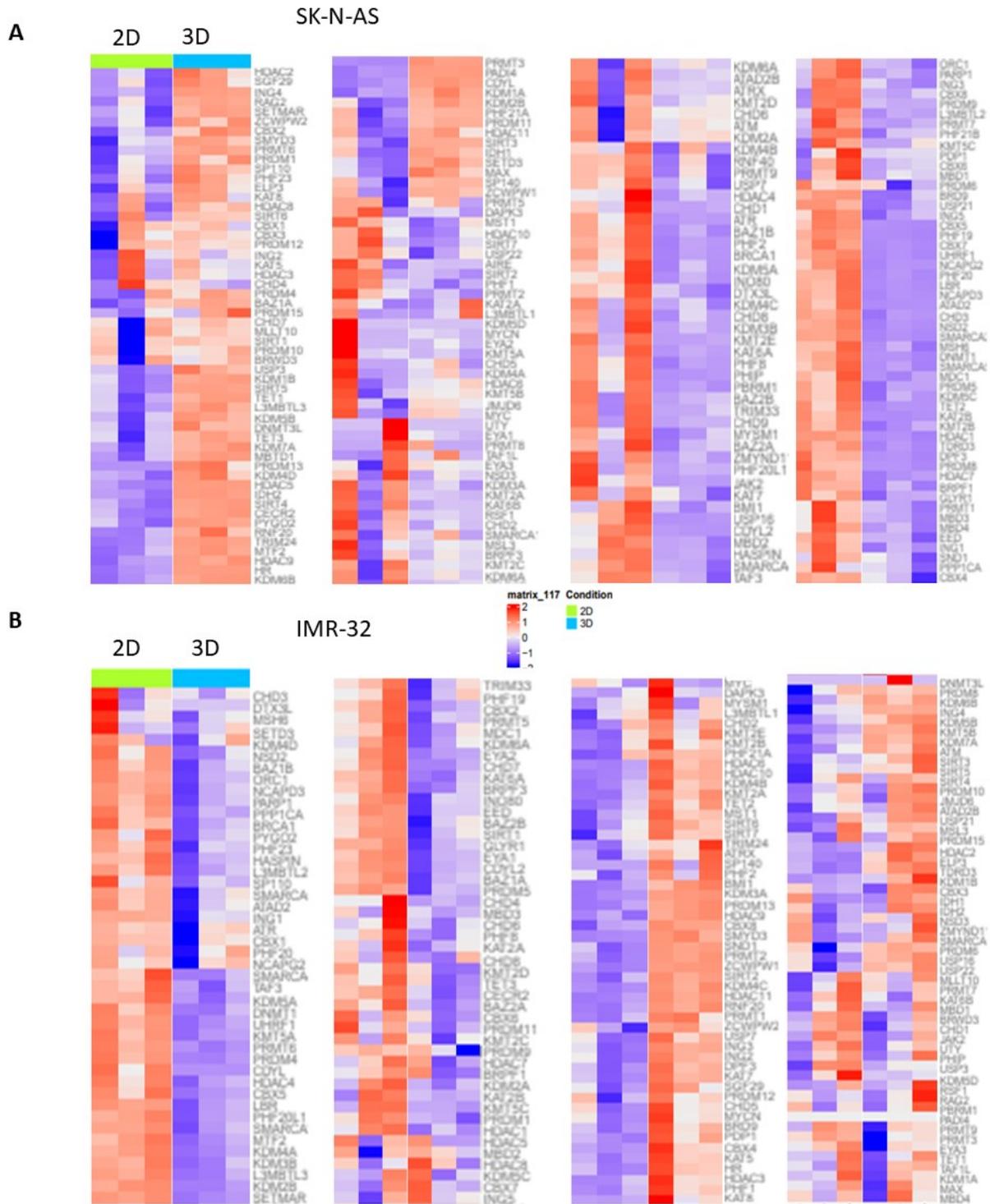


Figure 9. Analyse différentielle du profil d'expression de plusieurs gènes épigénétiques impliqués dans la méthylation et l'acétylation dans les lignées de neuroblastome SK-N-AS et IMR-32 en 2D comparativement au 3D à 24 jours de culture. A. Heatmap de l'expression

différentielle des gènes entre le 2D et le 3D à 24 jours de culture dans la lignée SK-N-AS. **B.** Heatmap de l'expression différentielle des gènes entre le 2D et le 3D à 24 jours de culture dans la lignée IMR-32. Une valeur de $p < 0.05$ et un $\log_2\text{foldchange} < -0,5$ pour les gènes sous exprimés et un $\log_2\text{foldchange} > 0,5$ pour les gènes sur exprimés ont été utilisés pour conserver les gènes différentiellement exprimés.

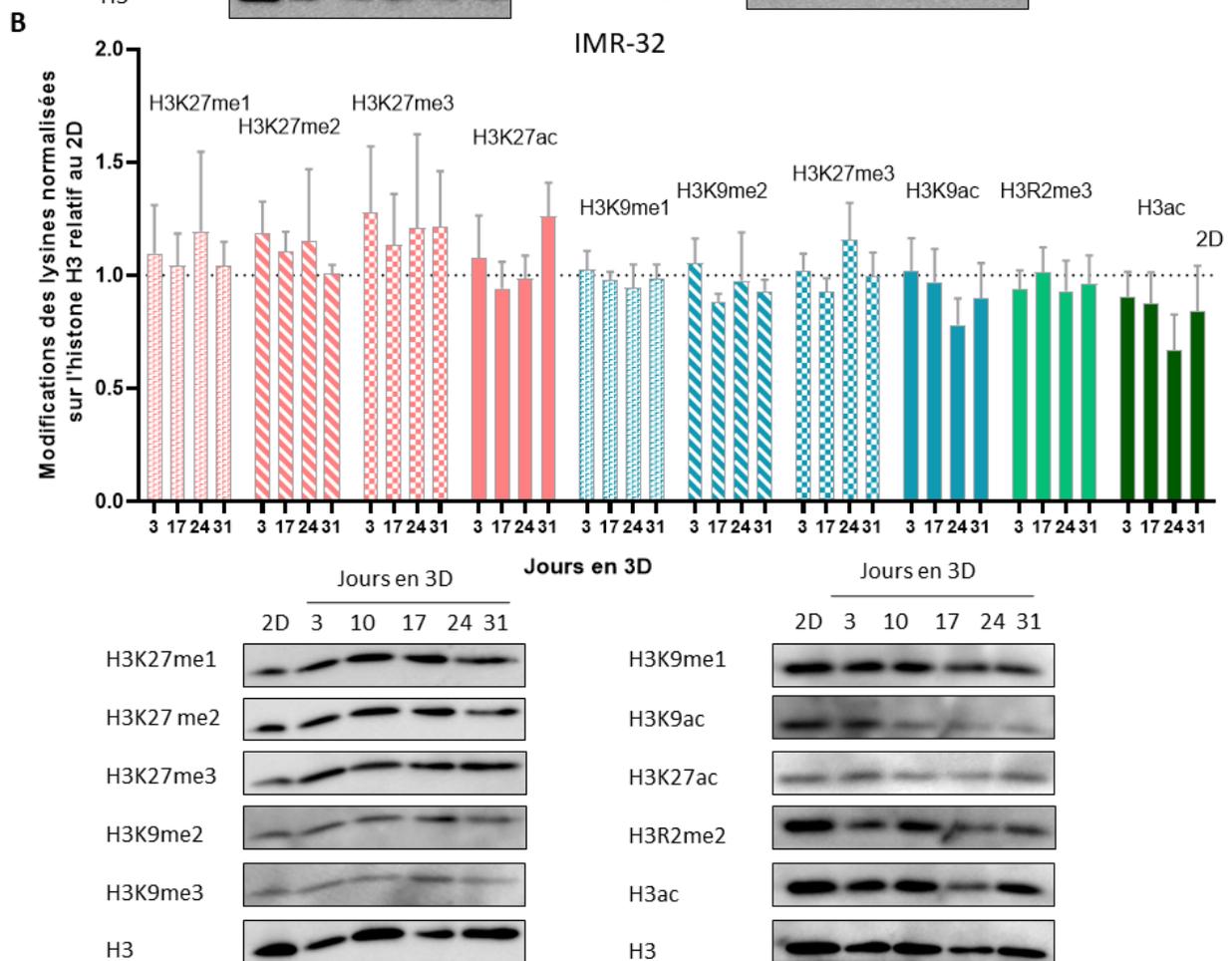
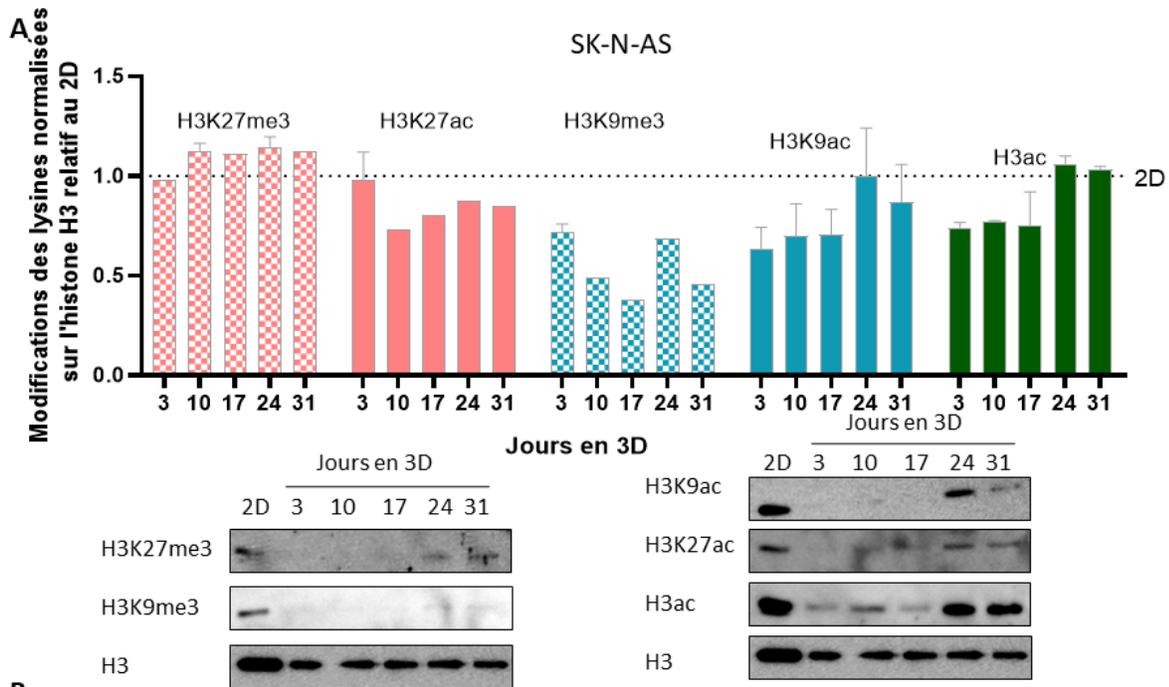


Figure 10. Quantification des niveaux globaux d'acétylation et de méthylation sur l'histone H3 en fonction du temps de culture en 3D comparativement au modèle en 2D dans les lignées SK-N-AS et IMR-32. **A.** Western blot et quantification des modifications des histones H3K27me3, H3K9me3, H3K9ac, H3K27ac et H3ac normalisée à l'expression de l'histone H3 et relatif à la culture 2D de la lignée SK-N-AS (N=2). **B.** Western blot et quantification des modifications des histones H3K27me1, H3K27me2, H3K27me, H3K9me1, H3K9me2, H3K9me3, H3K9ac, H3K27ac, H3R2me2 et H3ac normalisée à l'expression de l'histone H3 et à la culture 2D de la lignée IMR-32 (moyenne \pm SEM, N=3, analyse par Anova à deux facteurs avec le test de comparaison multiple de Tukey).

Analyse de l'expression de protéines immunologiques reliées à l'activité des cellules NK dans les lignées SK-N-AS, IMR-32 et IGR-N91 dans le modèle 2D comparativement au modèle 3D :

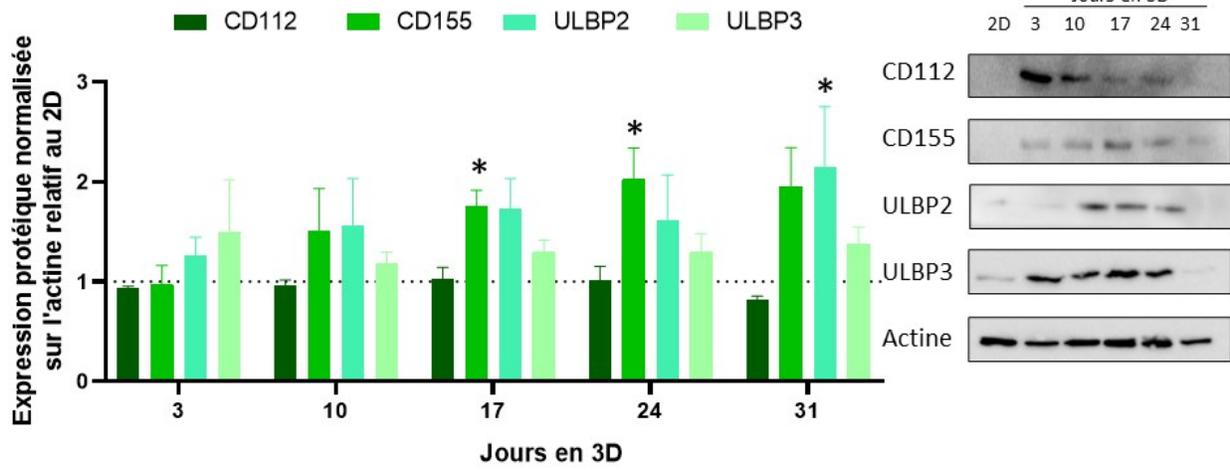
Nous avons mesuré les niveaux d'expression des gènes impliqués dans l'activité des cellules NK dans le but d'identifier une lignée plus résistante pour mieux représenter cette notion d'évasion immunitaire observée en clinique. Une analyse d'expression protéique des ligands des récepteurs des cellules NK a été réalisée sur les lignées SK-N-AS, IMR-32 et IGR-N91 suivie d'une analyse par séquençage d'ARN sur différents gènes immunologiques a été réalisée afin d'illustrer nos analyses (**Fig. 11-14**). Tout d'abord, les marqueurs activateurs CD112, CD155, MICA/B, ULBP 1-3 ont été analysés sur les trois lignées de neuroblastome (**Fig. 11A, 12A, 13A**). Les protéines MICA/B et ULBP1 n'ont été exprimées dans aucune lignée, de plus, dans les lignées IMR-32 et IGR-N91 aucune différence significative dans l'expression de ces ligands n'a été constatée (**Fig. 12A, 13A**). Dans le cas de la lignée SK-N-AS, le ligand CD155 est significativement plus exprimé en 3D à partir du jours 17 jusqu'au jours 31 avec un facteur d'environ 2. Le ligand ULBP3 quant à lui est significativement plus exprimé au jours 31 avec aussi un facteur d'environ 2 (**Fig. 11A**). De plus, le ligand HLA-E du récepteur inhibiteur NKG2A n'est pas significativement dérégulé dans les lignées IMR-32 et IGR-N91 tandis que ce dernier au jours 24 en 3D une surexpression allant à 3 fois l'expression de ce ligand en 2D est notable dans la lignée SK-N-AS (**Fig. 11B, 12B, 13B**). Ainsi, une expérience d'immunohistochimie a été effectuée à ce temps de culture sur deux ligands significativement surexprimés dans la lignée SK-N-AS : CD155 et HLA-E. Une surexpression en 3D en sphéroïde comparativement au 2D et aux sphéroïdes détachés est constatée corrélant ainsi

avec les expériences de Western Blot (**Fig. 11C**). L'utilisation d'un contrôle au modèle 3D en détachant les cellules a été effectué dans le but de confirmer l'expression différentielle des marqueurs (aux pourtours et à l'intérieur du sphéroïde) que l'on retrouve en 3D par une variabilité d'expression de ces marqueurs dans les cellules détachées. Le but a été de démontrer l'hétérogénéité d'expression des protéines membranaires dans les cellules composants le sphéroïde. On suppose que l'expression dans le sphéroïde détaché est faible ou inexistante dans la figure 1C due à l'utilisation de la trypsine qui a tendance à dégrader les protéines membranaires afin de dissocier les cellules entre elles.

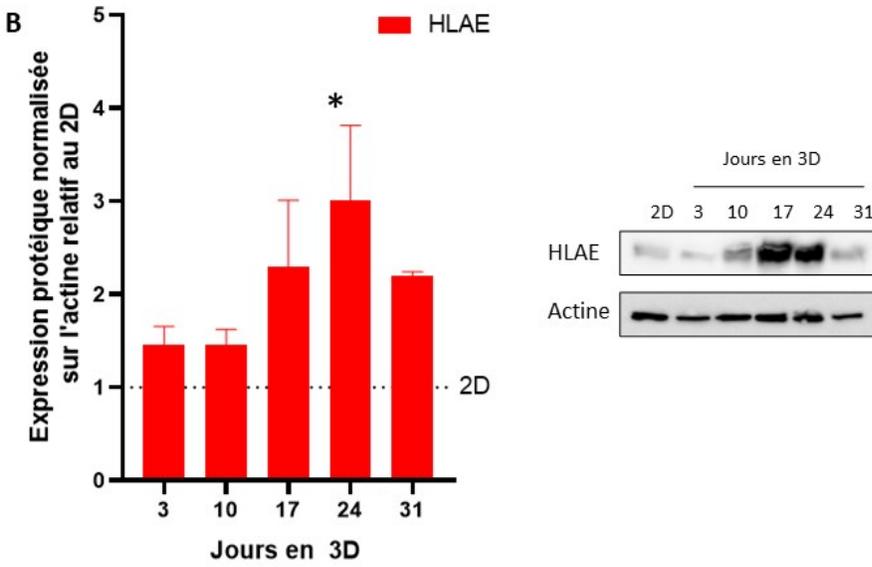
Finalement, dans les analyses de séquençage d'ARN, les résultats obtenus confirment ces changements d'expression. En effet, dans la figure 14, les heatmaps des gènes reliés à l'inflammation ainsi qu'aux ligands des cellules NK sont différentiellement exprimés. Tout d'abord une surexpression des gènes reliés à la relâche de cytokine et de chimiokines tels que *CCL2*, *CXCL10* sont surexprimés dans la lignée SK-N-AS (**Fig. 14A**), contrairement à la lignée IMR-32 ou l'on ne retrouve pas ce cas de figure (**Fig. 14B**). D'autre part, d'un point de vue de la cytotoxicité des cellules NK, les différents récepteurs de la famille HLA sont surexprimés se traduisant par une augmentation de la résistance à l'activité immunologique. On observe aussi une baisse d'activité des ligands des récepteurs activateurs suivant l'hypothèse de diminution d'activité des cellules NK (**Fig. 14A**). De plus, par analyse de l'enrichissement de l'ensemble des gènes lié à la régulation négative des cellules NK, un score d'enrichissement allant à 0.7 est observé dans le modèle 3D (**Fig. 14C**). Dans le cas des IMR-32, les ligands des récepteurs inhibiteurs ne démontrent pas d'expression différentielle, cependant, certains ligands des récepteurs activateurs sont sous exprimés tels que *PVR*, *ULBP1* et *ULBP3* (**Fig. 14B**). L'analyse de l'enrichissement des gènes reliés à la voie de régulation négative de l'activité des cellules NK démontre un score enrichissement équilibrée de cette voie lors du passage en culture 3D (**Fig. 14D**).

Ainsi, pour la suite de nos expériences, la lignée se rapprochant le plus à notre hypothèse est celle des SK-N-AS, le choix du jours 24 en 3D est aussi justifié par les changements d'expression des gènes d'où le choix de ce temps de culture pour la suite de nos travaux.

A



B



C

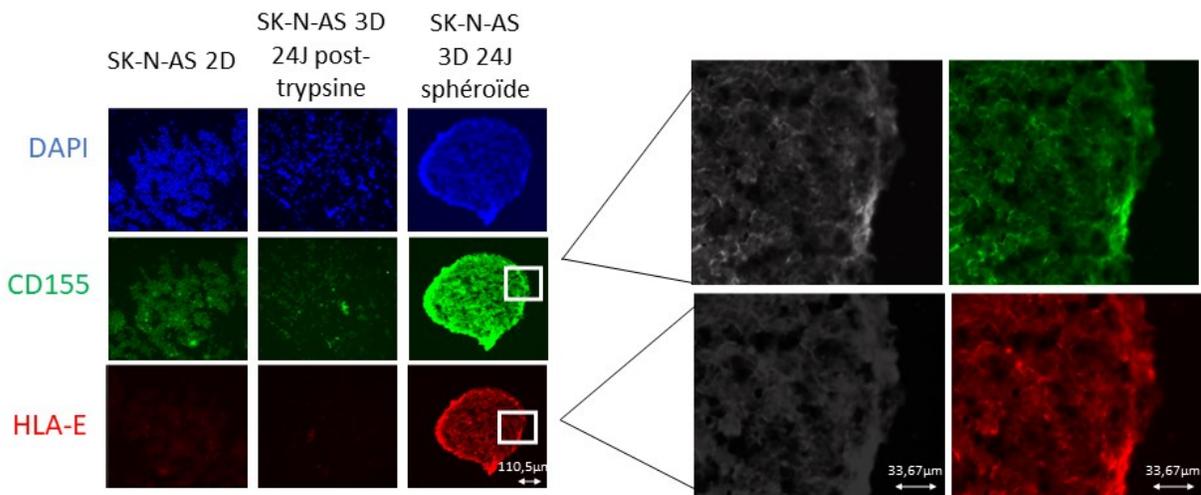
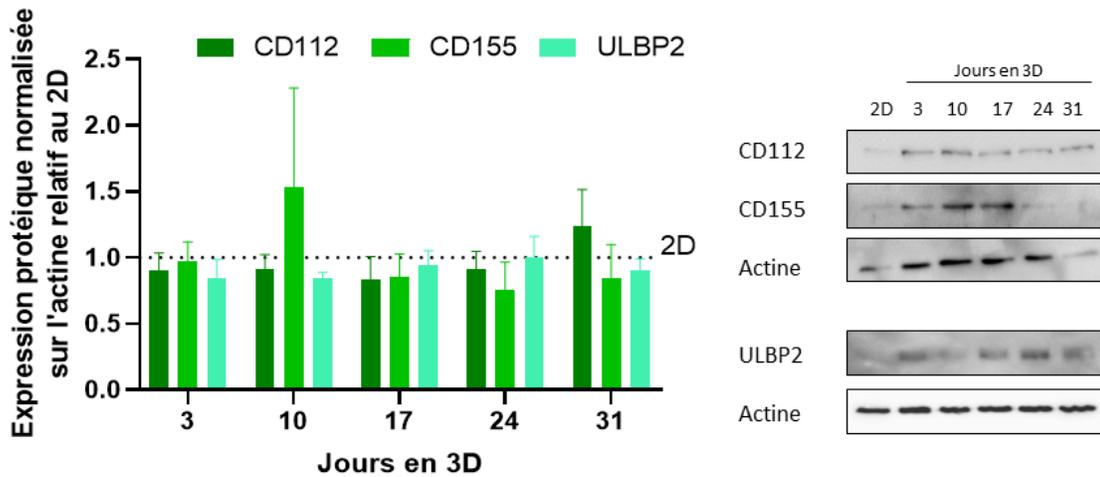


Figure 11. Caractérisation de l'expression protéique de marqueurs immunologiques de la lignée SK-N-AS en fonction du temps de culture en sphéroïdes. **A.** Western Blot et quantification de l'expression normalisée sur l'actine et relative à la culture 2D des ligands CD112, CD155, ULBP2 et ULBP3 des récepteurs activateurs des cellules NK, DNAM1 et NKG2D dérégulés dans le neuroblastome, en fonction du temps de culture en sphéroïdes. **B.** Western Blot et quantification de l'expression normalisée sur l'actine et relative à la culture 2D du ligand HLA-E du principal récepteur inhibiteur des cellules NK NKG2A dérégulé dans le neuroblastome, en fonction du temps de culture en sphéroïdes. **C.** Immunofluorescence des cellules SK-N-AS en 2D et en 3D en sphéroïde et après un détachement cellulaire à la trypsine, marquées au DAPI, aux ligands CD155 et HLA-E. Dapi: Bleu, CD155: Vert, HLA-E: Rouge (grossissement : 10X); (moyenne \pm SEM, N=3, *: $p < 0.05$ obtenu par Anova à deux facteurs avec le test de comparaison multiple de Tukey).

A



B

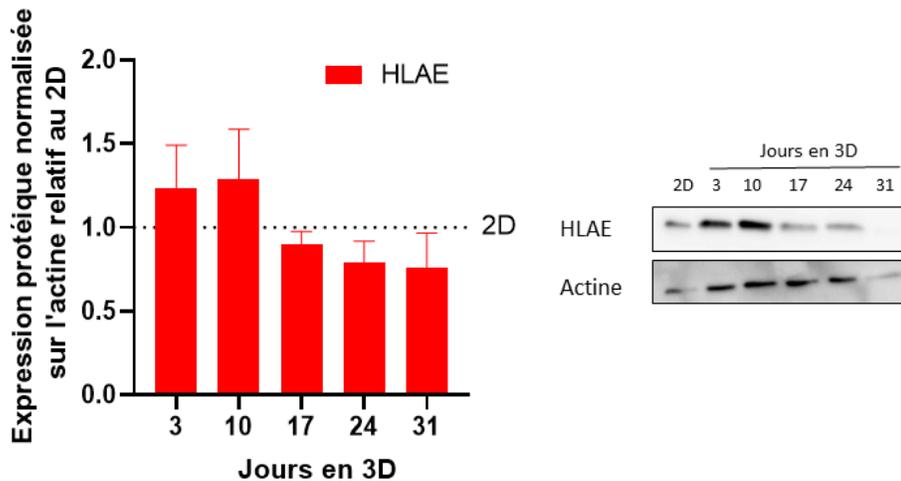


Figure 12. Caractérisation de l'expression protéique de marqueurs immunologiques de la lignée IMR-32 en fonction du temps de culture en sphéroïdes. A. Western Blot et quantification de l'expression normalisée sur l'actine et relative à la culture 2D des ligands CD112, CD155 et ULBP2 des récepteurs activateurs des cellules NK, DNAM1 et NKG2D dérégulés dans le neuroblastome, en fonction du temps de culture en sphéroïdes. **B.** Western Blot et quantification de l'expression normalisée sur l'actine et relative à la culture 2D du ligand HLA-E du principal récepteur inhibiteur des cellules NK NKG2A dérégulé dans le neuroblastome, en fonction du temps de culture en

sphéroïdes (moyenne \pm SEM, N=3, analyse par Anova à deux facteurs avec le test de comparaison multiple de Tukey).

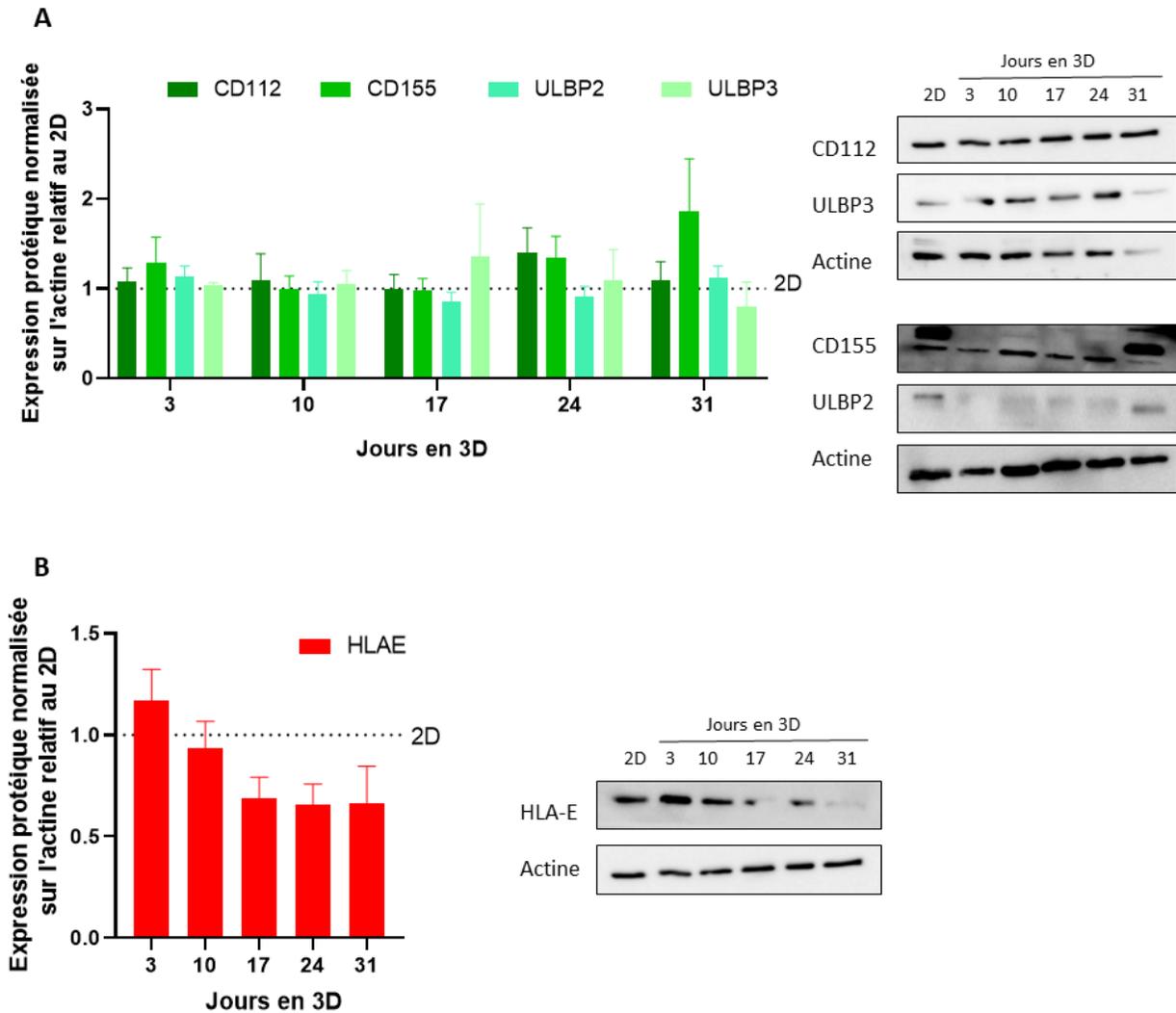


Figure 13. Caractérisation de l'expression protéique de marqueurs immunologiques de la lignée IGR-N91 en fonction du temps de culture en sphéroïdes. A. Western Blot et quantification de l'expression normalisée sur l'actine et relative à la culture 2D des ligands CD112, CD155, ULBP2 et ULBP3 des récepteurs activateurs des cellules NK, DNAM1 et NKG2D dérégulés dans le neuroblastome, en fonction du temps de culture en sphéroïdes. **B.** Western Blot et quantification de l'expression normalisée sur l'actine et relative à la culture 2D du ligand HLA-E du principal

récepteur inhibiteur des cellules NK NKG2A dérégulé dans le neuroblastome, en fonction du temps de culture en sphéroïdes (moyenne \pm SEM, N=3, analyse par Anova à deux facteurs avec le test de comparaison multiple de Tukey).

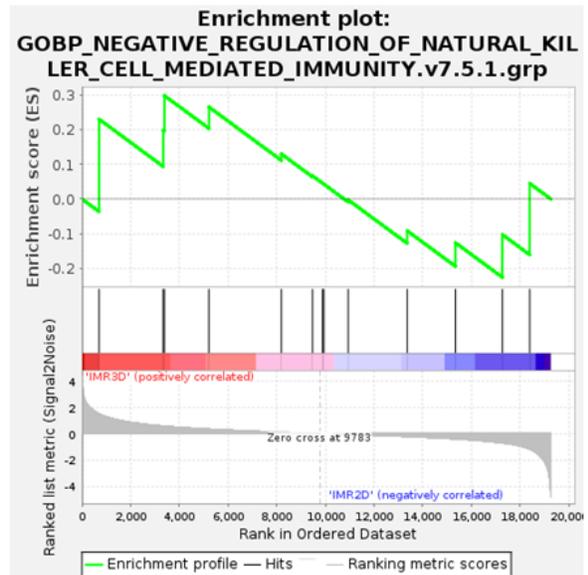
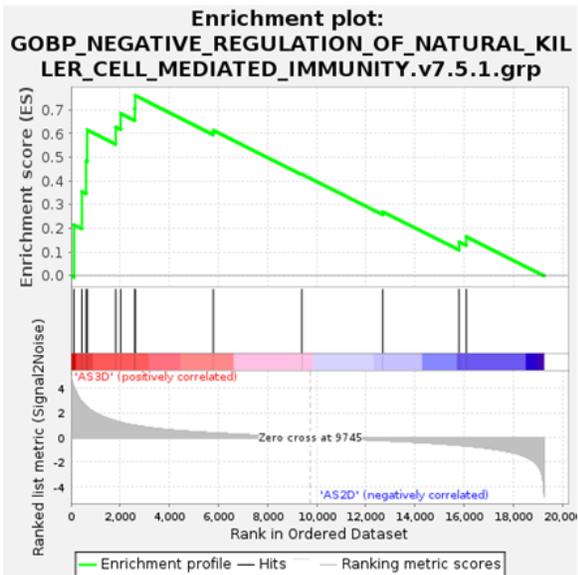
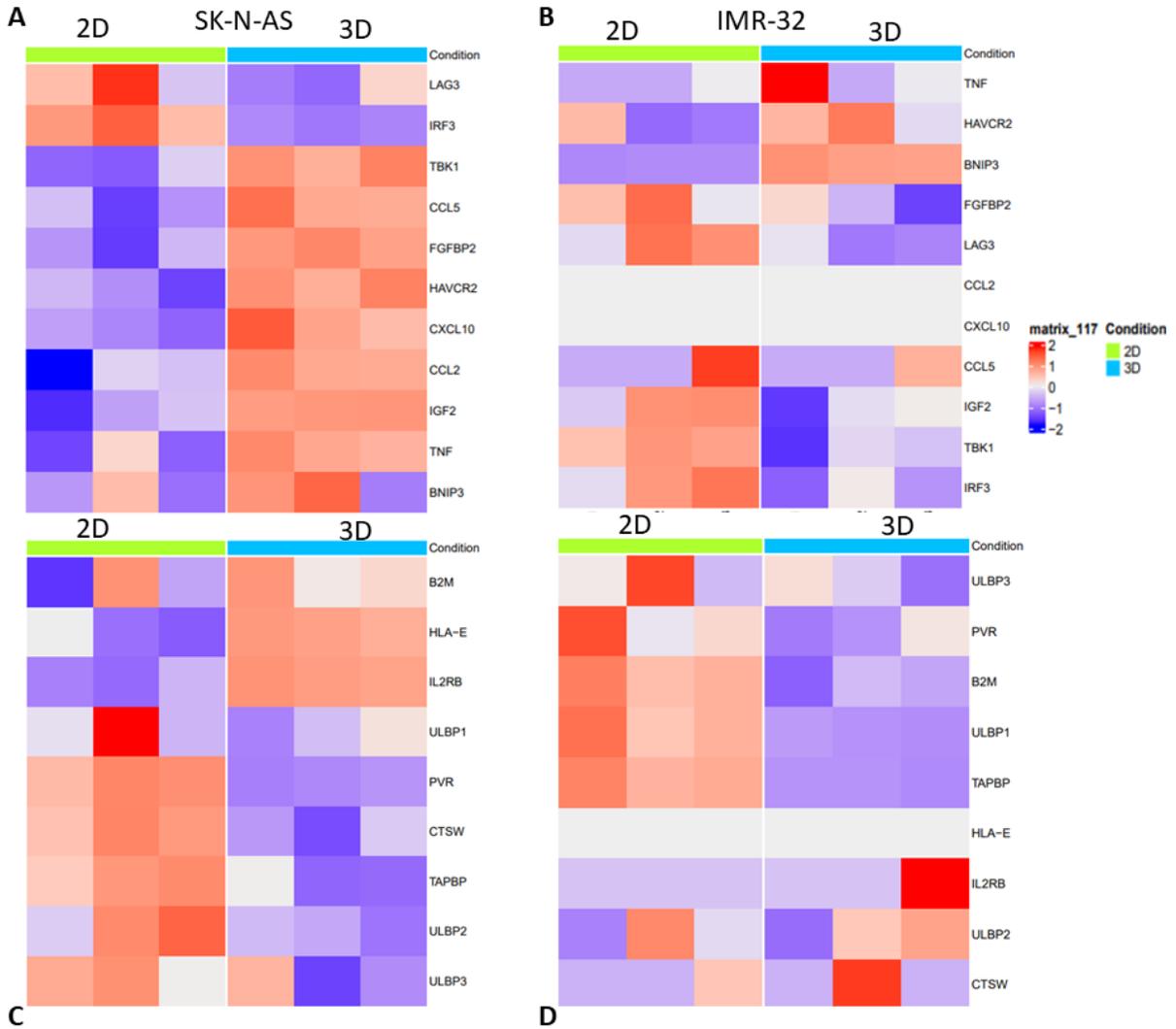


Figure 14. Analyse différentielle du profil d'expression de plusieurs gènes reliés à la réponse immunologique des cellules NK dans les lignées de neuroblastome SK-N-AS et IMR-32 en 2D comparativement au 3D à 24 jours de culture. **A.** Heatmap de l'expression différentielle des gènes reliés à l'inflammation entre le 2D et le 3D à 24 jours de culture dans la lignée SK-N-AS. **B.** Heatmap de l'expression différentielle des gènes reliés à l'inflammation entre le 2D et le 3D à 24 jours de culture dans la lignée IMR-32. **C.** Analyse de l'enrichissement de l'ensemble des gènes (GSEA) reliés à la voie de la régulation négative de l'immunité médiée par les NK entre le 2D et le 3D à 24 jours de culture dans la lignée SK-N-AS. **D.** Analyse de l'enrichissement de l'ensemble des gènes (GSEA) reliés à la voie de la régulation négative de l'immunité médiée par les NK entre le 2D et le 3D à 24 jours de culture dans la lignée IMR-32.

Analyse des interactions des cellules SK-N-AS sur les cellules NK92 par analyse du milieu conditionné en 2D ainsi qu'en 3D au jours 24 :

Notre hypothèse est que les cellules de neuroblastome sécrètent certains facteurs influençant l'activité des cellules NK et inhibant ainsi leur cytotoxicité. Dans le passage en sphéroïde au jours 24 dans la lignée SK-N-AS, une augmentation de différents gènes reliés à la sécrétion de chimiokines et de cytokines présentent un $\log_2\text{foldchange}$ supérieur à 1 se traduisant par une augmentation des interactions cellulaires de manière paracrine (**Fig. 15A**). Ainsi, les milieux de culture conditionnés de cellules SK-N-AS en 2D et en 3D au jours 24 ont été ajoutés au milieu de culture des cellules NK92 à 50% pour en analyser les effets sur leur croissance ainsi que sur l'expression des récepteurs activateurs principaux DNAM et NKG2D (**Fig. 15B**). Aucune différence n'a été constatée entre les différentes conditions de culture : contrôle, milieux conditionnés provenant de cellules en 2D, et milieux conditionnés provenant de cellules en 3D au jours 24. En effet, l'expression des récepteurs NKG2D et DNAM1 est similaire dans toutes les conditions, le nombre de cellules dans le temps en culture présente seulement une tendance à la baisse utilisant les milieux conditionnés et la viabilité présente aussi une tendance à la baisse sans toutefois être significative (**Fig. 15C-D**). Ainsi, cette facette de la notion d'évasion immunitaire n'a pas été explorée davantage.

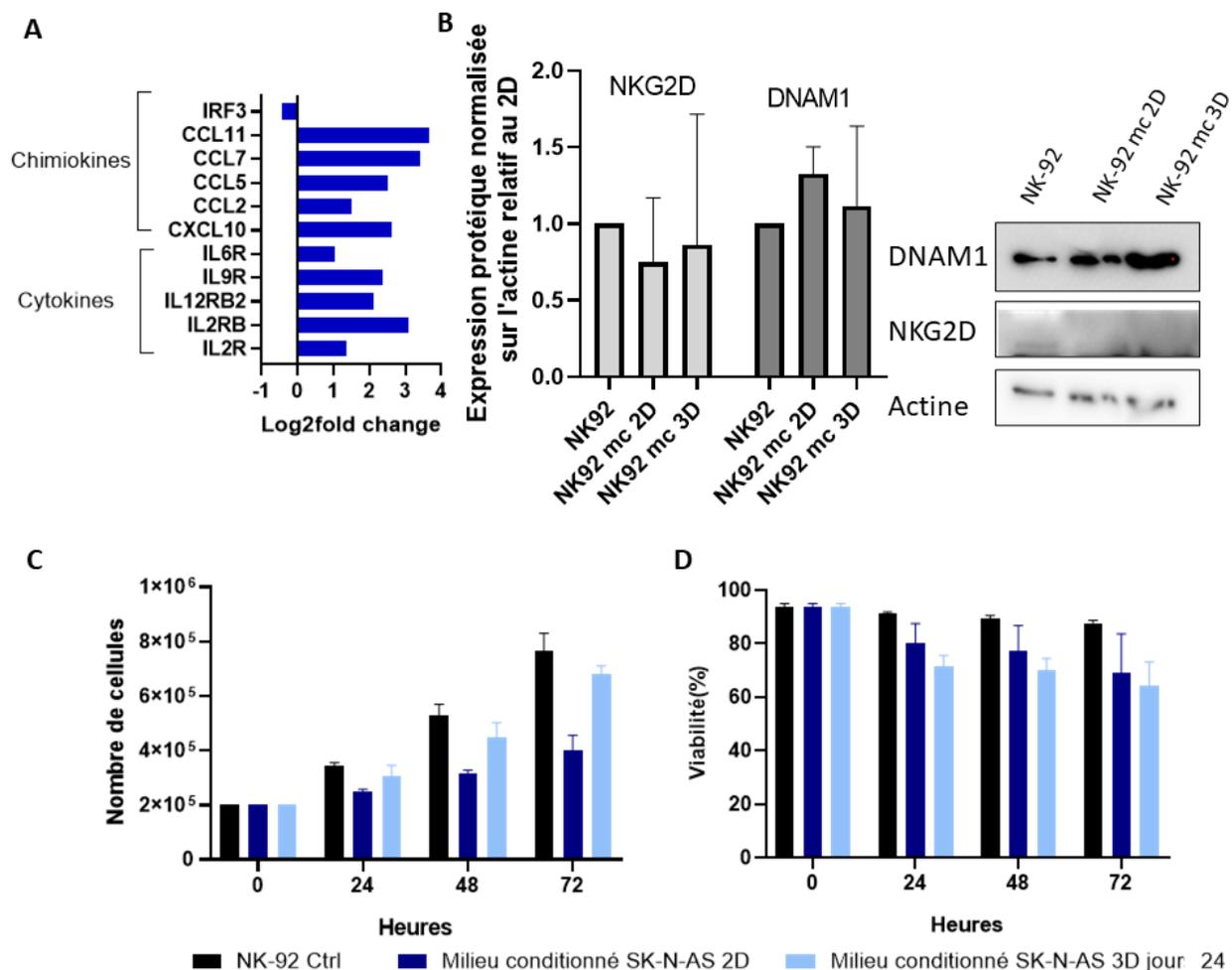


Figure 15. Analyse et impact du milieu conditionné des cellules SK-N-AS en 2D et en 3D au jour 24 sur les caractéristiques cellulaires des cellules NK92. **A.** Log2foldchange des marqueurs reliés à la sécrétion de chimiokines et de cytokines lors du passage en 3D au jour 24. **B.** Western Blot et quantification de l'expression des récepteurs activateurs NKG2D et DNAM1 des cellules NK92 à différentes conditions d'ajout du milieu conditionné de cellules SK-N-AS : en 2D, en 3D au jour 24 et avec du milieu DMEM comme contrôle pendant 72 heures et à 50% du volume total composé de RPMI à 20% de FBS. **C.** Analyse du nombre de cellules NK92 pendant 72h à des conditions d'ajout du milieu conditionné de cellules SK-N-AS. **D.** Analyse de la viabilité des cellules NK92 par cytométrie en flux pendant 72h à des conditions d'ajout du milieu conditionné de cellules SK-N-AS. N=2

Analyse de deux méthodes de co-culture en sphéroïdes avec les cellules SK-N-AS et NK92: la coculture 3D en agrégat mixte et la co-culture 3D par couches stratifiées:

Pour réaliser des expériences de co-culture en 3D avec des cellules NK92, la question du type de mise en culture se pose donc. Tout d'abord un ajout des cellules NK92 au moment de la mise en culture en 3D est désigné comme co-culture en agrégat mixte. Ensuite, une autre méthode, celle des sphéroïdes en couche stratifiée, se fonde sur l'ajout des cellules NK92 par centrifugation, 48 heures après la formation du sphéroïde (**Fig 16A-B**). Afin de déterminer quel type de co-culture serait la plus représentative de la tumeur *in situ*, une expérience de mesure de la cytotoxicité des cellules NK92 est effectuée 24 heures après la mise en co-culture afin de déterminer leur efficacité dans chacun des modèles 3D après 3 jours. Les valeurs obtenues ont été soustraites aux conditions contrôles soit en 2D et en 3D aux mêmes jours mais en monoculture. Les cellules NK92 sont marquées au CFSE pendant la mise en co-culture afin de différencier les deux populations et la mesure de viabilité se fait par cytométrie en flux en utilisant de l'iodure de propidium. Comme contrôle positif, des cellules K562 provenant d'une lignée leucémique sont utilisés puisque leur sensibilité aux cellules NK92 est bien connue.

Dans un premier temps, nous avons réalisé des observations par imagerie à l'Incucyte pendant les 24 heures de coculture. Nous observons une augmentation de cellules mortes dans notre contrôle en 2D tel qu'attendu. Pour les sphéroïdes, nous observons une accumulation de cellules NK92 CFSE+ dans le temps ainsi qu'une accumulation de débris cellulaires aux alentours avec les deux méthodes de co-culture en 3D (**Fig. 16D**). Cependant, nous notons que le sphéroïde se forme mieux dans la condition où la co-culture est sous forme de couche stratifiée avec les cellules de neuroblastome au centre et les cellules NK92 formant la couche externe.

Les résultats de cytotoxicité démontrent une hyperactivité des NK92 sur les cellules de neuroblastome avec la méthode en co-culture simultanée avec une valeur de cytotoxicité de 30% dans un ratio de 1 :1 de cellules NK92 et SK-N-AS. Dans le cas des autres ratios, aucune différence significative n'a été notée. La co-culture par enrobage en couche stratifiée démontre une valeur de cytotoxicité de 15% environ ce qui est semblable au modèle 2D (**Fig. 16C**). Ainsi, l'utilisation

de la co-culture par la méthode de couche stratifiée a fait le choix du type de modèle qui sera utilisé par la suite de nos expériences par sa résistance supérieure au modèle de co-culture par agrégat mixte.

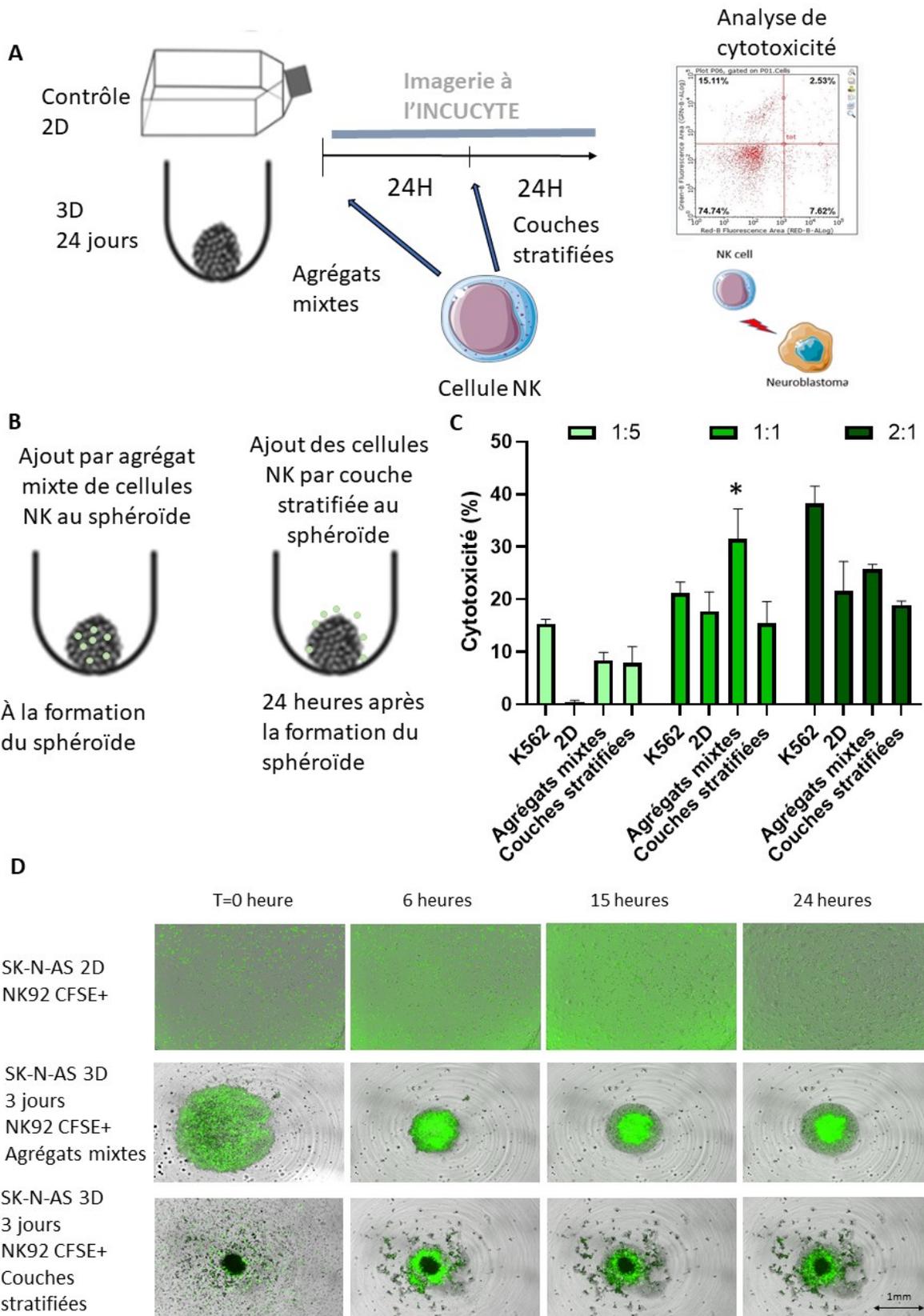


Figure 16. Analyse de deux méthodes de passage à la co-culture en sphéroïdes avec des cellules SK-N-AS et NK92. **A.** Schéma du modèle d'analyse d'imagerie à l'Incucyte S3 Live-Cell Analysis System et de cytotoxicité par cytométrie en flux. **B.** Schéma décrivant la co-culture par agrégat mixte et par couche stratifiée des cellules NK92 et SK-N-AS. **C.** Cytotoxicité mesurée à l'iodure de propidium des cellules NK92 sur les cellules SK-N-AS en 24 heures à des ratios de 1:5, 1:1 et 2:1 dans des conditions en 2D et en sphéroïdes au jour 3 par co-culture. Les cellules K562 sont utilisées comme contrôle positif. **D.** Images prises à l'Incucyte des conditions de co-culture en 2D et en 3D au jour 3 à un ratio de 1:1 pendant 24 heures avec des cellules NK92 CFSE+ et des cellules SK-N-AS (moyenne \pm SEM, N=3, *: $p < 0.05$ obtenu par Anova à un facteur avec le test de comparaison multiple de Tukey).

Caractérisation de la résistance aux cellules NK92 de manière fonctionnelle aux différents temps de co-culture en 3D pour la lignée SK-N-AS :

Afin de choisir le temps de culture reflétant la notion de résistance immunitaire du neuroblastome, des essais de cytotoxicité aux différents temps de culture en sphéroïdes et à différents ratios avec des cellules NK92 ont été effectués par co-culture en couche stratifiée. Les mesures de cytotoxicité ont été effectuées de la même manière que dans le cas du choix du type de co-culture.

Nous avons observé une diminution de la cytotoxicité des NK92 sur les cellules SK-N-AS au fil de la culture en 3D qui devient significative au jour 24 pour les ratios de 1 :1 et de 2 :1 (**Fig. 17A**). De plus, par imagerie à l'Incucyte, on observe que les sphéroïdes restent intacts durant tous les temps de culture démontrant la résistance aux cellules NK92 comparativement à la culture 2D. Les débris cellulaires observés aux alentours des sphéroïdes pourraient appartenir à la lignée SK-N-AS ou à celle des NK92 (**Fig. 17B**). Ainsi, le modèle en co-culture sélectionné pour les criblages de médicaments est celui des cellules SK-N-AS au jour 24 en 3D avec un ajout de cellules NK92 48 heures après la formation du sphéroïde par méthode de couche stratifiée suivi d'une analyse de viabilité 24 heures après l'ajout des cellules NK92 marquées au CFSE.

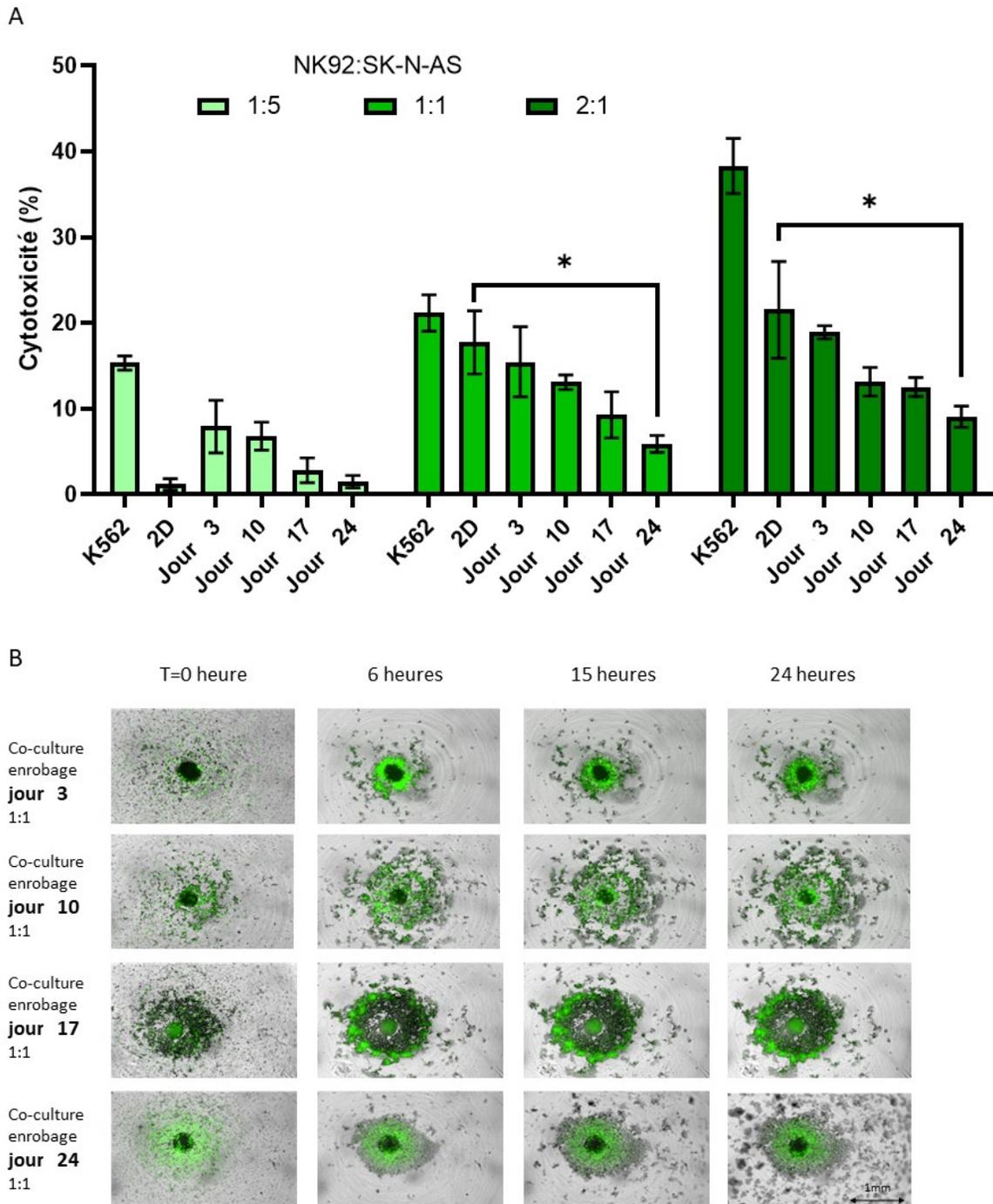


Figure 17. Caractérisation de la résistance aux cellules NK92 à travers le temps de culture des sphéroïdes de cellules SK-N-AS comparativement à la culture 2D. A. Cytotoxicité mesurée à l'iodure de propidium par cytométrie en flux au Guava des cellules NK92 sur les cellules SK-N-AS en 24 heures à des ratios de 1:5, 1:1 et 2:1 dans des conditions en 2D, à différents temps de

culture en 3D et avec des cellules K562 comme contrôle positif. **B.** Image prise à l'Incucyte des conditions de co-culture en 2D et en 3D à différents temps de culture à un ratio de 1:1 pendant 24 heures avec des cellules NK92 CFSE+ et des cellules SK-N-AS (moyenne \pm SEM, N=3, *: $p < 0.05$ obtenu par Anova à un facteur avec le test de comparaison multiple de Tukey).

Criblage de composés épigénétiques sur le modèle de coculture de cellules SK-N-AS au jours 24 en 3D avec des cellules NK92 :

Après avoir établi le modèle de coculture en 3D dans les conditions mimant le mieux la résistance aux cellules NK92, un criblage de composés épigénétiques a été effectué sur ce modèle en 3D au jour 24 à un ratio de 1 :1 dans le but d'identifier un potentiel traitement sensibilisant les cellules SK-N-AS aux cellules NK (**Fig. 18A**). L'ajout des cellules NK92 est effectué après le traitement afin d'induire une reprogrammation épigénétique sur les cellules cibles dans le but d'augmenter leur vulnérabilité aux cellules NK92. Ainsi, à la suite des 24 jours de culture en 3D, un pré-traitement de 181 composés épigénétiques à une concentration de 10 μ M a été effectué 24 heures après le passage des cellules. Par la suite, 24 heures après ce traitement, les cellules NK92 ont été ajoutées à un ratio de 1 :1 avec leur milieu de culture (RPMI). Il convient de noter que l'ajout des NK conduit à une diminution de la concentration des médicaments passant à 5 μ M durant les dernières 24 heures. Cette variation a été appliquée à notre condition en monoculture afin de pouvoir comparer des effets pharmacologiques équivalents en absence ou en présence des cellules NK92. Une analyse de cytotoxicité et une mesure de viabilité a été effectuée par la suite grâce au Guava (**Fig. 18A**). La moyenne des viabilités a été normalisée au contrôle DMSO/eau pour chaque condition donnant des valeurs en fonction du 100% de viabilité équivalent donc au contrôle non traité. Les viabilités induites par les différents composés sont représentées montrant d'une part une plus grande résistance aux médicaments dans le modèle 3D tel qu'attendu et d'autre part une plus grande résistance en 3D coculture qu'en 2D coculture avec les cellules NK92 (**Fig. 18B**). Ainsi, le modèle de culture en sphéroïde est plus résistant d'une manière globale aux traitements épigénétiques, à l'activité des cellules NK92 ainsi qu'au deux conditions réunies.

Par la suite, notre objectif est de trouver un médicament permettant d'accroître l'activité cytotoxique des cellules NK92 sur les cellules SK-N-AS cultivées 24 jours en 3D. Les données de

viabilité ont été représentées dans plusieurs graphiques comparant les différentes conditions entre elles (**Fig. 18C-E**). Une délimitation arbitraire à 50% de la viabilité totale a été effectuée afin d'identifier les médicaments ayant des effets dans chaque condition en délimitant le graphique en 4 quadrants différents : médicament actif dans les deux conditions, médicament inactif dans les deux conditions et médicament actif dans l'une des deux conditions. Les valeurs de délimitation des quadrants ont été effectuées par le calcul suivant : $50 \times 100 / \text{viabilité des contrôles}$. Ainsi, la délimitation représente une valeur de 50% de la viabilité non normalisée aux contrôles DMSO. Tout d'abord, une analyse comparant les viabilités en 2D ainsi qu'en 3D a été effectuée. Cette analyse révèle la présence de 3 médicaments n'ayant aucun effet en 2D mais engendrant une viabilité inférieure à 50% en 3D (BIX01294, SGI-1027 et CX6258 HCL) (**Fig. 18C**). Ainsi, les mécanismes de ces trois médicaments font partis des familles d'inhibiteur de DNMT pour le SGI-1027, d'inhibiteur d'histone méthyltransférase avec une spécificité pour G9a dans le cas du BIX01294 et d'inhibiteur de pan-Pim kinase pour le CX6258 HCL. D'autre part, en comparant les deux conditions de co-culture, un inhibiteur d'EGFR et JAK ainsi que trois inhibiteurs de HDAC ont été identifiés avec un effet sur la co-culture en 3D comparativement en 2D que l'on retrouve aussi dans une comparaison avec le 3D monoculture impliquant une augmentation de l'effet de ces médicaments avec l'exposition aux cellules NK92 (**Fig 18D-E**). Ainsi, le Tyrphostin B42 (inhibiteur EGFR et JAK), le Mocetinostat (inhibiteur d'HDAC non spécifique), le Dacinostat (inhibiteur d'HDAC1) et le Panobinostat (inhibiteur d'HDAC non spécifique) représentent des candidats potentiels sur la découverte de médicaments pouvant potentialiser l'effet cytotoxique des cellules NK92 dans le modèle établi.

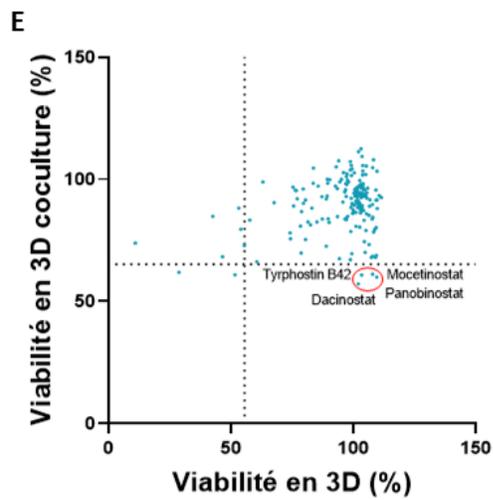
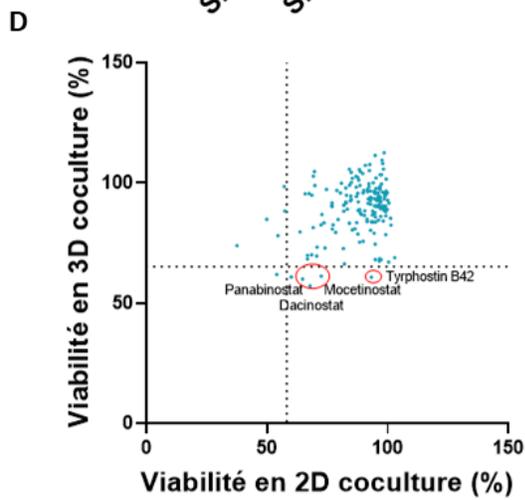
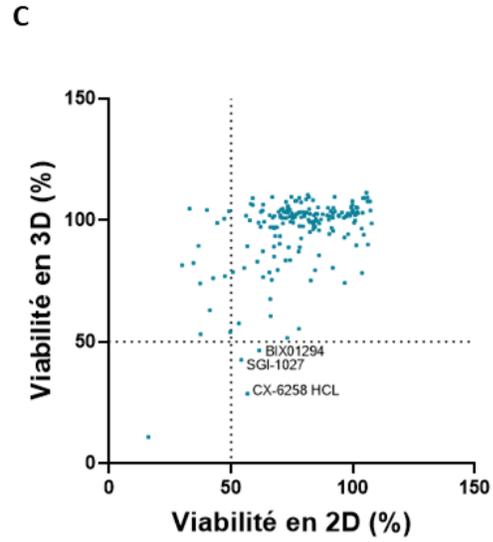
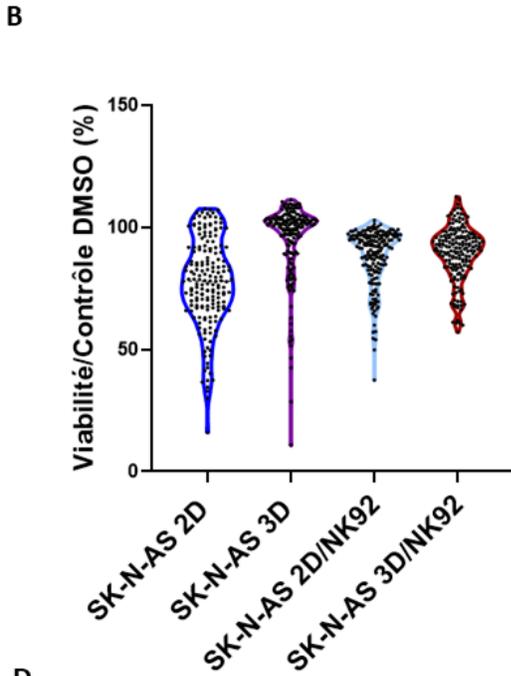
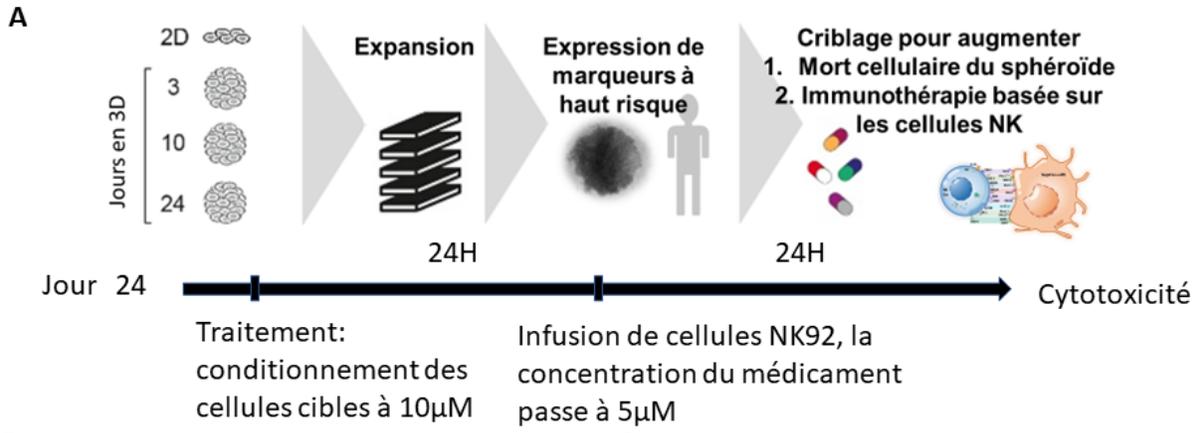


Figure 18. Criblage de 181 composés induisant des changements épigénétiques sur le modèle en coculture composés de cellules SK-N-AS et NK92 à un ratio 1:1. A. Schémas descriptifs du modèle de criblage de médicaments sur la co-culture avec des NK92 et des SK-N-AS en 3D au jour 24. **B.** Courbes de violon des viabilités des puits traitées pour chaque médicament dans le criblage épigénétique. **C.** Moyenne de viabilité en 3D et 2D des puits traités. Séparation à 50% de la viabilité totale et représentation des composés selon leur effet sur la viabilité dans les deux conditions. **D.** Moyenne de viabilité en 3D coculture et 2D coculture des puits traités. Séparation à 50% de la viabilité totale ($50 \times 100 / \text{Viabilité du contrôle}$) et représentation des composés selon leur effet sur la viabilité dans les deux conditions. **E.** Moyenne de viabilité en 3D coculture et 3D monoculture pour chacun des traitements. Séparation à 50% de la viabilité totale ($50 \times 100 / \text{Viabilité du contrôle}$) et représentation des composés selon leur effet sur la viabilité dans les deux conditions. (N=2).

Chapitre 4 : Discussion

La chance d'obtenir l'approbation pour la commercialisation de nouveaux médicaments une fois les phases cliniques débutées est extrêmement faible. Cela est due à l'utilisation de modèles insuffisamment représentatifs des tumeurs chez le patient d'un point de vue génétique et phénotypique (188). Ainsi, le développement et la caractérisation du modèle en sphéroïde pourrait s'avérer utile afin de réduire au maximum les différences que l'on retrouve entre les cellules en 2D et les tumeurs *in situ*.

Pour répondre à notre hypothèse où l'on suppose que la co-culture de cellules de neuroblastome en présence de cellules NK en 3D induit des changements transcriptionnels et épigénétiques se rapprochant d'une tumeur *in situ*, plusieurs caractéristiques cellulaires ont été analysées telles que la morphologie, la croissance ainsi que l'expression des gènes et des protéines. Ces différentes propriétés ont démontré une plus grande ressemblance entre le modèle 3D au jour 24 et le patient que le modèle classique 2D. Des cellules NK92 ont été ajoutées à ce modèle dans le but de définir un modèle mimant la résistance à la cytotoxicité des cellules NK que l'on retrouve en clinique. Grâce à une caractérisation et l'établissement des conditions optimales de coculture tels que le ratio, le temps de culture en 3D ainsi que le type de coculture, par couches stratifiées ou par agrégats mixtes, un modèle 3D en sphéroïdes de cellule SK-N-AS en coculture avec des cellules NK92 a permis le criblage de 181 composés afin d'identifier des médicaments ayant la capacité de sensibiliser les cellules de neuroblastome à l'activité des cellules NK92. Plusieurs composés appartenant à la famille des HDAC ont été identifiés. De futures expériences de validations et de caractérisation permettront de confirmer ces découvertes telles que des doses réponses en co-culture et en mono-culture sur chaque lignée, des analyses protéiques des cellules prétraitées et finalement des essais sur des modèles *in-vivo*. En effet, à la suite d'expériences doses réponses, une comparaison de l'effet de ces composés sur les différentes conditions et sur l'inhibition des protéines de surface sera déterminée grâce aux IC50 (concentration inhibitrice médiane) (216). On suppose qu'une corrélation entre l'inhibition des protéines HDAC et l'expression des ligands des récepteurs NK est présente.

Caractérisation du modèle en sphéroïde en monoculture :

Tout d'abord, d'un point de vue morphologique, le sphéroïde se compacte durant les premières 24 heures de culture en 3D, la taille des cellules n'est pas significativement variable. Nous avons supposé que cela était donc une conséquence de la création de jonctions cellulaires adhérentes et de l'établissement d'un nouveau réseau de communication cellulaire. En effet, plusieurs études définissent ce système de culture en sphéroïdes comme un système permettant d'examiner la communication entre les cellules par différentes interactions (cellule-cellule, cellule-microenvironnement, signalisation paracrine) (188, 217, 218). Ainsi, des expériences de Western Blot sur deux marqueurs (vimentine, vinculine) de la matrice extracellulaire sur les trois lignées cellulaires de neuroblastome ont été effectuées mais ne démontrent aucun changement significatif. La vimentine fait partie du cytosquelette et permet le maintien des structures cellulaires et permet la réponse au stress mécanique. La vinculine quant à elle permet la jonction entre les intégrines et le cytosquelette d'actine (219, 220). À la suite de ces expériences semi quantitative, un séquençage de l'ARN sur les lignées SK-N-AS et IMR-32 au jours 24 en 3D comparativement au 2D confirme nos suppositions. En effet, les voies d'expression principalement dérégulées dans les deux lignées sont celles de l'organisation de la matrice extracellulaire, de l'adhésion cellule-cellule, de la sécrétion cellulaire, du transport d'ions et de la chimiotaxie (voie paracrine). Ainsi, les protéines impliquées dans l'architecture du cytosquelette ne sont pas différentiellement exprimées, cependant, celles impliquées dans l'organisation de la matrice extracellulaire et impliquant l'interaction avec d'autres cellules sont augmentées. Cela justifie la meilleure représentation du modèle 3D afin d'étudier les interactions cellulaires en mono ou en co-culture par la présence de contacts et d'interactions plus intenses que le modèle 2D (221). Finalement, des changements d'expression de certains marqueurs liés à la transition épithélio-mésenchymateuse ont été analysés sous forme de heatmap. ZEB1, un facteur de transcription qui promeut la formation de métastases et la migration cellulaire est surexprimé, ce dernier est important dans la progression tumorale de plusieurs cancers pédiatriques dont le neuroblastome (222, 223). L'expression des gènes suit un changement variable qui induit un phénotype dépendant de la totalité de la balance de ces différences. On en déduit ainsi, que le modèle de culture en sphéroïde induit un changement dans les caractéristiques de

communication cellulaire, dans la structure et une réorganisation de la disposition de ces dernières due à des différences d'expression variable des gènes.

Dans une tumeur embryonnaire, en moyenne, le temps de doublement des cellules primaires est d'environ 27 jours contrairement aux cellules en 2D qui croient beaucoup plus rapidement avec un temps de doublement avoisinant les 30 heures (224). En sphéroïdes, une augmentation du temps de doublement est observée dans les trois lignées cellulaires avec un plateau aux alentours de 150 heures. De plus, une augmentation des phases quiescentes G0/G1 et une diminution des phases de croissance S et G2/M sont observées dans tous les temps de culture en 3D, ce qui est en accord avec la baisse de croissance cellulaire. La viabilité cellulaire suit la tendance de la proportion de cellules apoptotiques observée dans les expériences de cycle cellulaire. On en déduit que la baisse de viabilité est due à la présence de cellules non adaptées à la culture 3D.

La diminution de la croissance cellulaire est aussi identifiée dans les résultats des expériences de séquençage d'ARN, où l'on retrouve une sous-expression des voies de la réponse aux facteurs de croissance et du facteur de croissance lié à l'insuline (IGF), de la prolifération des populations cellulaires, de la réponse aux niveaux d'oxygène ainsi qu'une surexpression des niveaux d'hypoxie. Cela est traduit par des différences métaboliques et d'hypoxie due à la présence d'un gradient d'exposition aux nutriments et à l'oxygène au sein du sphéroïde (225).

Au niveau de la biologie neuronale et du développement des cellules de la crête neurale, les facteurs de transcription analysés régissent l'identité noradrénergique sympathique impliqués dans la différenciation du système nerveux sympathique et sont régulés et influencés par l'amplification de *MYCN* (226). Ainsi, l'analyse de ces résultats a permis d'identifier une identité cellulaire différente des cellules en 2D et les rapprochant au patient comme démontré dans la littérature avec une augmentation de plusieurs de ces marqueurs (*HAND2*, *RUNX2*, *GATA3*, *ISL1*) qui ont été analysés par Western Blot pour certains et par séquençage de l'ARN (85).

Dans le cadre de notre hypothèse de travail portant sur la modélisation de la résistance immunitaire en 3D, l'expression des ligands des récepteurs des cellules NK (*DNAM1*, *NKG2D* et *NKG2A*) a été analysée par Western Blot et par séquençage de l'ARN. Dans l'ensemble, les résultats démontrent que la lignée SK-N-AS en 3D au jour 24 représente un modèle qui possède

un certain degré de ressemblance avec les neuroblastomes soit une augmentation des ligands inhibiteurs tels que HLA-E et une diminution observée par séquençage des ligands activateurs PVR, MICA/B, ULBP1-3 (127). Ainsi, la lignée SK-N-AS semble récapituler la résistance immunitaire aux cellules NK comparativement aux autres lignées et celle-ci a été donc choisie pour la suite des expériences en coculture.

Finalement, d'un point de vue épigénétique, plusieurs gènes impliqués dans les réactions d'acétylation et de méthylation tels que *HDAC6*, *HDAC9*, *HDAC10*, *KMT5B*, *KMT2A*, *DNMT1*, *DNMT3*, *HDAC1* et *HDAC5* ont été analysés par séquençage ainsi que leurs marques d'histones associées dans le but d'identifier des cibles thérapeutiques. En effet, ces modifications peuvent être rétablies par des traitements pharmacologiques en utilisant par exemple un inhibiteur d'histone méthyltransférase ou un inhibiteur de HDAC (227). Bien que ces régulateurs épigénétiques étaient significativement dérégulés en 3D (surexprimés ou inhibés) par rapport au 2D, l'analyse des modifications des histones analysées au niveau global n'a pas reflété de tels changements. Cette absence de lien entre l'expression des régulateurs épigénétiques et les niveaux de leur modification sur les histones peut s'expliquer par le fait que d'autres enzymes épigénétiques peuvent agir de manière compensatoire. Cependant, il n'est pas exclu qu'au niveau local, sur des régions spécifiques de la chromatine, que la culture en 3D induise des changements sur les modifications des histones. Cette possibilité pourrait être quantifiée par des méthodes comme l'immunoprécipitation de la chromatine couplée au séquençage ou des méthodes de CUT & TAG. Enfin, cette analyse permet d'établir un lien au changement de sensibilité des cellules de neuroblastomes aux cellules NK par l'effet de la méthylation ou de l'acétylation qui régulent certains gènes ayant un lien à l'activité NK tels que les ligands de leurs récepteurs. En effet, il est connu que l'enzyme EZH2 inhibe l'expression de ULBP1 par une hyperméthylation de l'histone H3K27 et induit la sensibilisation des cellules de carcinome hépatocellulaire aux cellules NK (132). Le but de nos criblages était de sensibiliser les cellules de neuroblastome de façon épigénétique en modifiant les niveaux de méthylation, ou d'acétylation de manière à déréguler l'expression des gènes associés à la synapse immunologique grâce aux composés épigénétiques et de les resensibiliser à l'activité des cellules NK.

Caractérisation du modèle en sphéroïde en coculture :

Après avoir choisi le modèle de sphéroïdes SK-N-AS au jour 24, des essais fonctionnels de cytotoxicité ont été effectués à tous les temps de culture. En effet, l'activité des cellules NK repose sur une balance de signaux activateurs et inhibiteurs et non de l'activité de certains récepteurs spécifiques (228). Ainsi, les essais fonctionnels ont indiqué de manière globale l'effet de la culture 3D en fonction du temps sur la sensibilité aux cellules NK92. Deux méthodes de coculture ont été testées, et la co-culture par couche stratifiée a été choisie. Dans ce cas, on suppose que les récepteurs membranaires des cellules SK-N-AS dégradés possiblement par la trypsine sont réexprimés avant l'ajout des cellules NK92, comme le suggèrent plusieurs études sur l'effet de la trypsine sur les protéines membranaires et les caractéristiques cellulaires en 3D comme la présence de jonctions adhérentes (229, 230). Ainsi, les différentes méthodes de co-culture utilisant un modèle 3D retrouvées dans la littérature diffèrent dans la conception du sphéroïde utilisant ou non un support de matrigel/collagène selon les objectifs des analyses. Cependant, l'ajout du second type cellulaire de la co-culture est effectué après la formation et la stabilisation du sphéroïde pour une meilleure étude des interactions entre les cellules (231-233). Dans une étude impliquant l'utilisation d'un modèle 3D de co-culture avec des cellules NK et des cellules de tumeurs pédiatriques de neuroblastome et de rhabdomyosarcome, de manière similaire à nos essais de cytotoxicité, l'utilisation d'un ratio de 1 :1 entre des cellules NK et des cellules tumorales en 3D ne démontrent pas d'effet sur la formation du sphéroïde et présente une faible cytotoxicité. Dans cette étude, un ratio de 10 :1 et un temps d'exposition de 72 heures sont utilisés ce qui induit une désagrégation du sphéroïde (234). Dans notre cas, l'utilisation d'un ratio de 1 :1 ainsi qu'un temps d'exposition de 24 heures est justifié du fait que les cellules en 2D, plus sensibles à l'activité des cellules NK92 présenteront une faible viabilité. En utilisant un modèle présentant une viabilité inférieure à 50%, l'effet des médicaments du criblage sur l'activité des cellules NK est plus compliqué à mettre en évidence. Finalement, les changements d'expression des gènes liés aux cellules NK analysés par Western Blot, par séquençage de l'ARN et par immunofluorescence concorde avec les résultats fonctionnels obtenues en co-culture. Le passage en culture 3D des cellules SK-N-AS induit donc un changement au niveau de la synapse immunologique sur les ligands de récepteurs NKG2D, DNAM1 et NKG2A influençant en majeure partie la sensibilité aux cellules NK (190).

Criblage de composés épigénétiques :

Comme suggéré dans la littérature, le modèle 3D démontre une meilleure résistance aux médicaments comparativement au modèle 2D (188). Dans notre étude, nous avons trouvé trois composés spécifiques aux sphéroïdes qui induisent une cytotoxicité spécifiquement en 3D et pas en 2D. Le BIX01294 et le SGI-1027, deux inhibiteurs de la méthylation et le CX-6258 un inhibiteur Pim-kinase forment de potentiels traitement dans notre modèle en monoculture agissant sur la viabilité des cellules en monoculture de manière cytotoxique. Le BIX01294 agit sur G9a (KMT1C) et induit donc la mort cellulaire en réduisant la méthylation de H3K9 et H3K27 (235). Dans le neuroblastome, ce dernier diminue la mobilité cellulaire, la prolifération, l'invasion et la migration. En effet, BIX01294 diminue la stabilité HIF-1 α dans des conditions hypoxiques et supprime la signalisation VEGF/VEGFR-2 (236). Les résultats de cette étude sur son effet sur l'angiogenèse et sur l'hypoxie concordent avec son efficacité spécifique au modèle 3D qui selon nos expériences démontre une augmentation de l'adaptation cellulaire aux conditions hypoxiques. Le SGI-1027 est un inhibiteur de *DNMT1*, *DNMT3A* et *DNMT3B*, qui sont dérégulés en 3D comparé au 2D sur les SK-N-AS. En effet, *DNMT1* est sous exprimé et *DNMT3A* et *DNMT3B* sont surexprimés en 3D justifiant la spécificité à ce modèle. Dans la littérature, ce dernier entraîne une apoptose cellulaire sur des cellules de carcinome hépatocellulaire humain, cependant aucune étude n'a été effectuée sur le neuroblastome hormis un essai de combinaison avec la Doxorubicine donnant une cytotoxicité synergique des deux composés (237, 238). Finalement, le CX-6258 est un inhibiteur des Pim-kinase, qui sont surexprimés dans les tumeurs de leucémie et du lymphome. Il existe 3 Pim-kinases qui agissent de manière compensatoire et l'inhibition simultanée des kinases Pim-1, Pim-2 et Pim-3 semble être une stratégie prometteuse de développement de médicaments anti-cancéreux (239). Ainsi, dans une étude sur des cellules de cancer du poumons non à petites cellules la surexpression de Pim-1 est liée à un mauvais pronostic et une combinaison d'Osimertinib au CX-6258 a inhibé fortement la prolifération et la migration cellulaires et a induit efficacement l'apoptose (240). Par la suite de nos expériences, une caractérisation des Pim entre le modèle 2D et 3D du neuroblastome avec et sans traitement nous informerait sur la spécificité de ce médicament au modèle en sphéroïdes dans notre criblage épigénétique. Ce composé n'a fait l'objet d'aucune étude sur le neuroblastome.

D'autre part, en coculture, le Tyrphostin B42, le Mocetinostat, le Dacinostat, et le Panobinostat ont été identifiés comme spécifiques à ce modèle. Le Tyrphostin B42 aussi appelé AG490 agit sur l'IL-6, JAK2 et STAT3 et inhibe l'activité proliférative en induisant l'apoptose des cellules en régulant les gènes liés aux mitochondries dans le cancer du pancréas. Dans cette étude, il est utilisé dans le cadre de contrer la pharmacorésistance du traitement chimiothérapeutique de la Trichostatine A, un inhibiteur de HDAC (241). L'IL-6 est une interleukine pro inflammatoire libérée notamment par les cellules NK et par les cellules du microenvironnement tumoral et possède une activité pro-tumorale dans le sens où cette dernière favorise la croissance des neuroblastes et inhibe l'activité immunitaire des cellules NK (125, 242). Ainsi, étant surexprimée chez les patients atteints de cancer du pancréas ainsi qu'en 3D (pour son récepteur) comme observé sur la figure 15, l'IL-6 induit la phosphorylation de JAK ce qui crée un site de recrutement à STAT, un activateur de la transcription. Ce dernier permet la régulation de plusieurs gènes régulant la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules tumorales. Le Tyrphostin B42 tire son activité thérapeutique par l'inhibition de cette voie (241). Dans notre cas cette voie semble plus active en 3D qu'en 2D par l'augmentation de la présence d'IL-6. De plus, en présence de cellules NK92 en co-culture, on suppose qu'une augmentation d'IL-6 est responsable de la spécificité de ce modèle à l'effet du Tyrphostin B42. Le Mocetinostat, le Dacinostat et le Panobinostat font partie de la famille des inhibiteurs de HDAC, une famille de protéines impliquées dans l'inhibition des gènes régulateurs immunitaires dans les cellules tumorales et immunitaires d'où une réponse cytotoxique supérieure dans la condition de co-culture (243). Le Mocetinostat qui cible les HDAC de classe I et IV module les gènes liés au système immunitaire dans les cellules tumorales ainsi que les différents types de cellules immunitaires présents dans le microenvironnement tumoral et améliore le traitement par inhibiteur de point de contrôle (243). D'autre part, ce dernier induit l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et inhibe la croissance tumorale chez les patients atteints de tumeurs malignes hématologiques dans une étude clinique de phase 2 (244). Ainsi, afin de surmonter le principal défi de la thérapie utilisant les inhibiteurs de HDAC qui est leur inefficacité dans les tumeurs solides, une combinaison de thérapie avec des traitements immunothérapeutiques dans le but d'augmenter l'efficacité de ces traitements et de l'activité des cellules immunitaires sur les cellules tumorales (245). Dans une étude, un score permettant de

prédire le pronostic des patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire a été défini par l'utilisation du caractère souche basé sur l'expression de l'ARNm, le score immunitaire et les bases de données TCGA. La comparaison de l'ARNm et du score immunitaire suggère que ce score classe l'infiltration tumorale. En sélectionnant les principaux gènes dérégulés lorsque ce score est élevé et considéré comme à haut risque, des composés ont été sélectionnés en ayant un score d'enrichissement < à 97 (c'est-à-dire ayant un effet sur ces gènes). Sur 65 composés, 9 sont des inhibiteurs HDAC comprenant le Dacinostat (246). Selon une étude, le prétraitement au Panobinostat a agi en synergie avec les cellules NK pour médier la cytotoxicité des cellules tumorales de carcinome hépatocellulaire. Dans cette étude, le traitement a augmenté l'expression de l'adhérence cellulaire et des gènes liés aux jonctions serrées, a favorisé la formation de liens entre les cellules NK et tumorales et module les récepteurs et les ligands d'activation des cellules NK sur les cellules tumorales, contribuant à l'augmentation de la cytolyse tumorale (247). De plus, parallèlement à nos résultats où ce dernier est inefficace en monoculture, le Panobinostat démontre une perte significative des avantages thérapeutiques dans le groupe appauvri en cellules NK sur un modèle *in vivo* sur des souris (247). Finalement, dans le neuroblastome, plusieurs études de combinaison du Panobinostat avec du Cisplatine, de la Doxorubicine, de l'Étoposide, de la Curaxine ou encore de la Chloroquine ont été effectuées et démontrent l'aspect prometteur de ce composé de la classe des inhibiteurs HDAC pouvant être utilisé avec d'autres traitements (248-250).

Ainsi, dans cette étude, la culture en 3D induit des changements transcriptionnels et épigénétiques se rapportant au profil d'expression des gènes d'une tumeur de patient comparativement à la culture en 2D. Cependant par la variabilité des différents cas de neuroblastome, le modèle 3D devrait être testé dans un contexte de cellules dérivées de patients et de tumeur *in vivo* (251). En effet, suite à une greffe de cellules sur des souris, ces dernières sont confrontées à un microenvironnement différent impliquant des changements transcriptionnels qui pourraient être analysés (252). De plus, l'utilisation de cellules NK primaires pourrait illustrer les résultats obtenus avec la lignée NK92. L'utilisation de la lignée cellulaire SK-N-AS ne récapitule pas la variabilité du neuroblastome, ainsi, l'utilisation du modèle 3D dans d'autres lignées cellulaires ainsi que l'utilisation d'organoïdes dérivées de patient comme

comparaison du profil transcriptionnel pourrait être établie. Finalement, la délétion de certains gènes dérégulés lors du passage en sphéroïdes pourrait confirmer une causalité de la résistance fonctionnelle du modèle 3D aux cellules NK.

Conclusion et perspectives

Pour conclure, la culture de cellules de neuroblastomes en sphéroïdes semble mieux représenter la tumeur in-situ que la culture en monocouche selon plusieurs propriétés tumorales. Ces propriétés sont en effet différentes d'un point de vue d'expression des gènes et des protéines dans les deux modèles, mais suivent une variation complexe qui doit encore être exploré de manière fonctionnelle. Par exemple par des essais de migration cellulaire pourraient être effectués suite aux résultats observés sur l'expression des gènes liés à la transition épithélio-mésenchymateuse.

La propriété de résistance immunitaire d'une tumeur est ici mieux représentée dans le contexte 3D avec une variation d'expression des gènes liés aux ligands des récepteurs dictant l'activité des cellules NK. Ainsi, cette variation d'expression suit la logique selon laquelle les cellules tumorales deviennent moins sensibles à l'activité cytotoxique des cellules NK. En effet, les ligands des récepteurs activateurs sont exprimés à la baisse et les ligands des récepteurs inhibiteurs sont exprimés à la hausse. De manière fonctionnelle, les essais de cytotoxicité en coculture ont permis de valider ces résultats et de déterminer les caractéristiques de notre modèle de criblage.

Le criblage de composés épigénétiques a permis de découvrir que des inhibiteurs d'histones méthyltransférases et un inhibiteur de PIM-kinase ont démontré de meilleurs résultats en 3D qu'en 2D et d'autre part des inhibiteurs HDAC démontrent l'augmentation d'activité des cellules NK92 sur les cellules SK-N-AS.

Des essais de validation devront être effectués sur chacun des médicaments suivant des doses réponses ainsi que des analyses protéiques et sur les histones (cibles épigénétiques et immunologiques). De plus, une combinaison qui n'a jamais été testée permettant de diminuer les doses entre un inhibiteur HDAC spécifique aux cellules NK tel que le Panobinostat et un inhibiteur d'histone méthyltransférase tel que BIX01294 spécifique à la culture 3D permettrait de cibler de deux manières la cytotoxicité des cellules SK-N-AS. D'une part en inhibant la méthylation et d'autre part en sensibilisant les cellules SK-N-AS aux NK en inhibant les HDACs. Finalement, l'étude de ces composés sur des modèles murins dans le but de sensibiliser la tumeur aux cellules

NK serait intéressante en combinaison aux thérapies d'injection de ces cellules après l'expansion à l'aide d'interleukines.

Références bibliographiques

1. Mahapatra S, Challagundla KB. Neuroblastoma. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.

2. Whittle SB, Smith V, Doherty E, Zhao S, McCarty S, Zage PE. Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2017;17(4):369-86.

3. Shimada H, Umehara S, Monobe Y, Hachitanda Y, Nakagawa A, Goto S, et al. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer.* 2001;92(9):2451-61.

4. Heck JE, Ritz B, Hung RJ, Hashibe M, Boffetta P. The epidemiology of neuroblastoma: a review. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2009;23(2):125-43.

5. Henderson TO, Bhatia S, Pinto N, London WB, McGrady P, Crotty C, et al. Racial and ethnic disparities in risk and survival in children with neuroblastoma: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2011;29(1):76-82.

6. Borriello L, Seeger RC, Asgharzadeh S, DeClerck YA. More than the genes, the tumor microenvironment in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2016;380(1):304-14.

7. Colon NC, Chung DH. Neuroblastoma. *Adv Pediatr.* 2011;58(1):297-311.

8. Brodeur GM. Spontaneous regression of neuroblastoma. *Cell Tissue Res.* 2018;372(2):277-86.

9. Swift CC, Eklund MJ, Kraveka JM, Alazraki AL. Updates in Diagnosis, Management, and Treatment of Neuroblastoma. *Radiographics.* 2018;38(2):566-80.

10. Rajwansi A, Srinivas R, Upasana G. Malignant small round cell tumors. *J Cytol.* 2009;26(1):1-10.

11. Diede SJ. Spontaneous regression of metastatic cancer: learning from neuroblastoma. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(2):71-2.

12. Tsubota S, Kadomatsu K. Origin and initiation mechanisms of neuroblastoma. *Cell Tissue Res.* 2018;372(2):211-21.

13. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer.* 1999;86(2):364-72.

14. Teshiba R, Kawano S, Wang LL, He L, Naranjo A, London WB, et al. Age-dependent prognostic effect by Mitosis-Karyorrhexis Index in neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Dev Pathol.* 2014;17(6):441-9.

15. Roy Choudhury S, Karmakar S, Banik NL, Ray SK. Targeting angiogenesis for controlling neuroblastoma. *J Oncol.* 2012;2012:782020.

16. Valter K, Zhivotovsky B, Gogvadze V. Cell death-based treatment of neuroblastoma. *Cell Death Dis.* 2018;9(2):113.

17. Cheung NK, Dyer MA. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(6):397-411.

18. SF. G. *Developmental Biology.* 6th edition. The Neural Crest. 2000.

19. Simões-Costa M, Bronner ME. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development*. 2015;142(2):242-57.
20. Johnsen JI, Dyberg C, Wickström M. Neuroblastoma-A Neural Crest Derived Embryonal Malignancy. *Front Mol Neurosci*. 2019;12:9.
21. Chen QW, Zhu XY, Li YY, Meng ZQ. Epigenetic regulation and cancer (review). *Oncol Rep*. 2014;31(2):523-32.
22. Ponzoni M, Bachetti T, Corrias MV, Brignole C, Pastorino F, Calarco E, et al. Recent advances in the developmental origin of neuroblastoma: an overview. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022;41(1):92.
23. Huang M, Weiss WA. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(10):a014415-a.
24. Chesler L, Weiss WA. Genetically engineered murine models--contribution to our understanding of the genetics, molecular pathology and therapeutic targeting of neuroblastoma. *Semin Cancer Biol*. 2011;21(4):245-55.
25. Schmidt ML, Lukens JN, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Gerbing RB, 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):1260-8.
26. Otte J, Dyberg C, Pepich A, Johnsen JI. MYCN Function in Neuroblastoma Development. *Front Oncol*. 2020;10:624079.
27. Gabay M, Li Y, Felsher DW. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(6).
28. Wenzel A, Schwab M. The mycN/max protein complex in neuroblastoma. Short review. *Eur J Cancer*. 1995;31a(4):516-9.
29. Guccione E, Martinato F, Finocchiaro G, Luzi L, Tizzoni L, Dall' Olio V, et al. Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nat Cell Biol*. 2006;8(7):764-70.
30. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med*. 1985;313(18):1111-6.
31. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(3):203-16.
32. Kang JH, Rychahou PG, Ishola TA, Qiao J, Evers BM, Chung DH. MYCN silencing induces differentiation and apoptosis in human neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;351(1):192-7.
33. Greengard EG. Molecularly Targeted Therapy for Neuroblastoma. *Children (Basel)*. 2018;5(10).
34. Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugières L, Ribeiro A, de Pontual L, Combaret V, et al. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature*. 2008;455(7215):967-70.
35. Trigg RM, Turner SD. ALK in Neuroblastoma: Biological and Therapeutic Implications. *Cancers (Basel)*. 2018;10(4).
36. Tolbert VP, Coggins GE, Maris JM. Genetic susceptibility to neuroblastoma. *Curr Opin Genet Dev*. 2017;42:81-90.

37. Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, Cupples R, Bucay N, Arakawa T, et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*. 1997;14(4):439-49.
38. Bresler SC, Weiser DA, Huwe PJ, Park JH, Krytska K, Ryles H, et al. ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma. *Cancer Cell*. 2014;26(5):682-94.
39. Vivancos Stalin L, Gualandi M, Schulte JH, Renella R, Shakhova O, Mühlethaler-Mottet A. Expression of the Neuroblastoma-Associated ALK-F1174L Activating Mutation During Embryogenesis Impairs the Differentiation of Neural Crest Progenitors in Sympathetic Ganglia. *Front Oncol*. 2019;9:275.
40. Zhu S, Lee JS, Guo F, Shin J, Perez-Atayde AR, Kutok JL, et al. Activated ALK collaborates with MYCN in neuroblastoma pathogenesis. *Cancer Cell*. 2012;21(3):362-73.
41. Schönherr C, Ruuth K, Kamaraj S, Wang CL, Yang HL, Combaret V, et al. Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) regulates initiation of transcription of MYCN in neuroblastoma cells. *Oncogene*. 2012;31(50):5193-200.
42. Bown N. Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. *J Clin Pathol*. 2001;54(12):897-910.
43. Van Roy N, Laureys G, Cheng NC, Willem P, Opdenakker G, Versteeg R, et al. 1;17 translocations and other chromosome 17 rearrangements in human primary neuroblastoma tumors and cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994;10(2):103-14.
44. Savelyeva L, Corvi R, Schwab M. Translocation involving 1p and 17q is a recurrent genetic alteration of human neuroblastoma cells. *Am J Hum Genet*. 1994;55(2):334-40.
45. Durinck K, Speleman F. Epigenetic regulation of neuroblastoma development. *Cell Tissue Res*. 2018;372(2):309-24.
46. Hamilton JP. Epigenetics: principles and practice. *Dig Dis*. 2011;29(2):130-5.
47. Gibney ER, Nolan CM. Epigenetics and gene expression. *Heredity (Edinb)*. 2010;105(1):4-13.
48. Fetahu IS, Taschner-Mandl S. Neuroblastoma and the epigenome. *Cancer Metastasis Rev*. 2021;40(1):173-89.
49. Baylin SB, Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(9).
50. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007;128(4):683-92.
51. Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*. 2011;333(6047):1300-3.
52. Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, et al. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med*. 2000;6(5):529-35.
53. Hopkins-Donaldson S, Bodmer JL, Bourlout KB, Brognara CB, Tschopp J, Gross N. Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res*. 2000;60(16):4315-9.
54. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(15):8681-6.

55. Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, et al. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res.* 1999;59(21):5438-42.
56. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(12):988-93.
57. Asada K, Abe M, Ushijima T. Clinical application of the CpG island methylator phenotype to prognostic diagnosis in neuroblastomas. *J Hum Genet.* 2013;58(7):428-33.
58. Handy DE, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation.* 2011;123(19):2145-56.
59. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011;21(3):381-95.
60. Molina-Serrano D, Kyriakou D, Kirmizis A. Histone Modifications as an Intersection Between Diet and Longevity. *Front Genet.* 2019;10:192.
61. Milazzo G, Mercatelli D, Di Muzio G, Triboli L, De Rosa P, Perini G, et al. Histone Deacetylases (HDACs): Evolution, Specificity, Role in Transcriptional Complexes, and Pharmacological Actionability. *Genes (Basel).* 2020;11(5).
62. Jubierre L, Jiménez C, Rovira E, Soriano A, Sábado C, Gros L, et al. Targeting of epigenetic regulators in neuroblastoma. *Exp Mol Med.* 2018;50(4):1-12.
63. Li T, Song B, Wu Z, Lu M, Zhu WG. Systematic identification of Class I HDAC substrates. *Brief Bioinform.* 2014;15(6):963-72.
64. Chakrabarti A, Oehme I, Witt O, Oliveira G, Sippl W, Romier C, et al. HDAC8: a multifaceted target for therapeutic interventions. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(7):481-92.
65. Li J, Chen S, Cleary RA, Wang R, Gannon OJ, Seto E, et al. Histone deacetylase 8 regulates cortactin deacetylation and contraction in smooth muscle tissues. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014;307(3):C288-95.
66. Waltregny D, De Leval L, Glénisson W, Ly Tran S, North BJ, Bellahcène A, et al. Expression of histone deacetylase 8, a class I histone deacetylase, is restricted to cells showing smooth muscle differentiation in normal human tissues. *Am J Pathol.* 2004;165(2):553-64.
67. Oehme I, Deubzer HE, Wegener D, Pickert D, Linke JP, Hero B, et al. Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. *Clin Cancer Res.* 2009;15(1):91-9.
68. Oehme I, Deubzer HE, Lodrini M, Milde T, Witt O. Targeting of HDAC8 and investigational inhibitors in neuroblastoma. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009;18(11):1605-17.
69. Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet.* 2012;13(5):343-57.
70. Jubierre L, Jiménez C, Rovira E, Soriano A, Sábado C, Gros L, et al. Targeting of epigenetic regulators in neuroblastoma. *Exp Mol Med.* 2018;50(4):51-.
71. van Mierlo G, Veenstra GJC, Vermeulen M, Marks H. The Complexity of PRC2 Subcomplexes. *Trends Cell Biol.* 2019;29(8):660-71.
72. Müller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, Wild B, et al. Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell.* 2002;111(2):197-208.
73. Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, et al. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell.* 2008;32(4):503-18.

74. Margueron R, Justin N, Ohno K, Sharpe ML, Son J, Drury WJ, 3rd, et al. Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature*. 2009;461(7265):762-7.
75. Wang C, Liu Z, Woo CW, Li Z, Wang L, Wei JS, et al. EZH2 Mediates epigenetic silencing of neuroblastoma suppressor genes CASZ1, CLU, RUNX3, and NGFR. *Cancer Res*. 2012;72(1):315-24.
76. Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*. 2006;439(7078):871-4.
77. Corvetta D, Chayka O, Gherardi S, D'Acunto CW, Cantilena S, Valli E, 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):8332-41.
78. Tsubota S, Kishida S, Shimamura T, Ohira M, Yamashita S, Cao D, et al. PRC2-Mediated Transcriptomic Alterations at the Embryonic Stage Govern Tumorigenesis and Clinical Outcome in MYCN-Driven Neuroblastoma. *Cancer Res*. 2017;77(19):5259-71.
79. Wang L, Chen C, Song Z, Wang H, Ye M, Wang D, et al. EZH2 depletion potentiates MYC degradation inhibiting neuroblastoma and small cell carcinoma tumor formation. *Nat Commun*. 2022;13(1):12.
80. Zimmerman MW, Durbin AD, He S, Opperl F, Shi H, Tao T, et al. Retinoic acid rewires the adrenergic core regulatory circuitry of childhood neuroblastoma. *Sci Adv*. 2021;7(43):eabe0834.
81. Gryder BE, Pomella S, Sayers C, Wu XS, Song Y, Chiarella AM, et al. Histone hyperacetylation disrupts core gene regulatory architecture in rhabdomyosarcoma. *Nat Genet*. 2019;51(12):1714-22.
82. Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, Abraham BJ, Lin CY, Kagey MH, et al. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell*. 2013;153(2):307-19.
83. Jahangiri L, Tsaprouni L, Trigg RM, Williams JA, Gkoutos GV, Turner SD, et al. Core regulatory circuitries in defining cancer cell identity across the malignant spectrum. *Open Biol*. 2020;10(7):200121.
84. Chen Y, Xu L, Lin RY, Müschen M, Koeffler HP. Core transcriptional regulatory circuitries in cancer. *Oncogene*. 2020;39(43):6633-46.
85. Boeva V, Louis-Brennetot C, Peltier A, Durand S, Pierre-Eugène C, Raynal V, et al. Heterogeneity of neuroblastoma cell identity defined by transcriptional circuitries. *Nat Genet*. 2017;49(9):1408-13.
86. Jahangiri L, Pucci P, Ishola T, Pereira J, Cavanagh ML, Turner SD. Deep analysis of neuroblastoma core regulatory circuitries using online databases and integrated bioinformatics shows their pan-cancer roles as prognostic predictors. *Discov Oncol*. 2021;12(1):56.
87. Durbin AD, Zimmerman MW, Dharia NV, Abraham BJ, Iniguez AB, Weichert-Leahey N, et al. Selective gene dependencies in MYCN-amplified neuroblastoma include the core transcriptional regulatory circuitry. *Nat Genet*. 2018;50(9):1240-6.
88. Blavier L, Yang RM, DeClerck YA. The Tumor Microenvironment in Neuroblastoma: New Players, New Mechanisms of Interaction and New Perspectives. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10).
89. Shimada H, Stram DO, Chatten J, Joshi VV, Hachitanda Y, Brodeur GM, et al. Identification of subsets of neuroblastomas by combined histopathologic and N-myc analysis. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(19):1470-6.

90. Chlenski A, Liu S, Crawford SE, Volpert OV, DeVries GH, Evangelista A, et al. SPARC is a key Schwannian-derived inhibitor controlling neuroblastoma tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2002;62(24):7357-63.
91. Rössler J, Breit S, Havers W, Schweigerer L. Vascular endothelial growth factor expression in human neuroblastoma: up-regulation by hypoxia. *Int J Cancer.* 1999;81(1):113-7.
92. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86(3):353-64.
93. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(9):582-98.
94. Zeine R, Salwen HR, Peddinti R, Tian Y, Guerrero L, Yang Q, et al. Presence of cancer-associated fibroblasts inversely correlates with Schwannian stroma in neuroblastoma tumors. *Mod Pathol.* 2009;22(7):950-8.
95. Wienke J, Dierselhuis MP, Tytgat GAM, Künkele A, Nierkens S, Molenaar JJ. The immune landscape of neuroblastoma: Challenges and opportunities for novel therapeutic strategies in pediatric oncology. *Eur J Cancer.* 2021;144:123-50.
96. Louault K, Bonneaud TL, Séveno C, Gomez-Bougie P, Nguyen F, Gautier F, et al. Interactions between cancer-associated fibroblasts and tumor cells promote MCL-1 dependency in estrogen receptor-positive breast cancers. *Oncogene.* 2019;38(17):3261-73.
97. Bianchi G, Morandi F, Cilli M, Daga A, Bocelli-Tyndall C, Gambini C, et al. Close interactions between mesenchymal stem cells and neuroblastoma cell lines lead to tumor growth inhibition. *PLoS One.* 2012;7(10):e48654.
98. Metelitsa LS, Wu HW, Wang H, Yang Y, Warsi Z, Asgharzadeh S, et al. Natural killer T cells infiltrate neuroblastomas expressing the chemokine CCL2. *J Exp Med.* 2004;199(9):1213-21.
99. Borriello L, Seeger RC, Asgharzadeh S, DeClerck YA. More than the genes, the tumor microenvironment in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2016;380(1):304-14.
100. Chuluyan HE, Lang BJ, Yoshimura T, Kenney JS, Issekutz AC. Chemokine production and adhesion molecule expression by neural cells exposed to IL-1, TNF alpha and interferon gamma. *Life Sci.* 1998;63(21):1939-52.
101. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
102. Fehniger TA, Caligiuri MA. Ontogeny and expansion of human natural killer cells: clinical implications. *Int Rev Immunol.* 2001;20(3-4):503-34.
103. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol.* 2018;9:1869.
104. Wu SY, Fu T, Jiang YZ, Shao ZM. Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Mol Cancer.* 2020;19(1):120.
105. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell.* 1997;91(5):661-72.
106. Carotta S, Pang SH, Nutt SL, Belz GT. Identification of the earliest NK-cell precursor in the mouse BM. *Blood.* 2011;117(20):5449-52.
107. Rosmaraki EE, Douagi I, Roth C, Colucci F, Cumano A, Di Santo JP. Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur J Immunol.* 2001;31(6):1900-9.
108. Boulanger MJ, Garcia KC. Shared cytokine signaling receptors: structural insights from the gp130 system. *Adv Protein Chem.* 2004;68:107-46.

109. Gasteiger G, Hemmers S, Firth MA, Le Floc'h A, Huse M, Sun JC, et al. IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *J Exp Med*. 2013;210(6):1167-78.
110. Mortier E, Bernard J, Plet A, Jacques Y. Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor alpha-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist. *J Immunol*. 2004;173(3):1681-8.
111. Skak K, Frederiksen KS, Lundsgaard D. Interleukin-21 activates human natural killer cells and modulates their surface receptor expression. *Immunology*. 2008;123(4):575-83.
112. Chan CJ, Smyth MJ, Martinet L. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death Differ*. 2014;21(1):5-14.
113. Morisaki T, Onishi H, Katano M. Cancer immunotherapy using NKG2D and DNAM-1 systems. *Anticancer Res*. 2012;32(6):2241-7.
114. Borst L, van der Burg SH, van Hall T. The NKG2A-HLA-E Axis as a Novel Checkpoint in the Tumor Microenvironment. *Clin Cancer Res*. 2020;26(21):5549-56.
115. Eagle RA, Trowsdale J. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(9):737-44.
116. Champsaur M, Lanier LL. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol Rev*. 2010;235(1):267-85.
117. Shibuya A, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, McClanahan T, et al. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity*. 1996;4(6):573-81.
118. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med*. 2003;198(4):557-67.
119. Buckle I, Guillerey C. Inhibitory Receptors and Immune Checkpoints Regulating Natural Killer Cell Responses to Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(17).
120. van Hall T, André P, Horowitz A, Ruan DF, Borst L, Zerbib R, et al. Monalizumab: inhibiting the novel immune checkpoint NKG2A. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):263.
121. Chattopadhyay PK, Betts MR, Price DA, Gostick E, Horton H, Roederer M, et al. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J Leukoc Biol*. 2009;85(1):88-97.
122. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004;294(1-2):15-22.
123. Chiossone L, Dumas PY, Vienne M, Vivier E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(11):671-88.
124. Prager I, Liesche C, van Ooijen H, Urlaub D, Verron Q, Sandström N, et al. NK cells switch from granzyme B to death receptor-mediated cytotoxicity during serial killing. *J Exp Med*. 2019;216(9):2113-27.
125. McNerney KO, Karageorgos SA, Hogarty MD, Bassiri H. Enhancing Neuroblastoma Immunotherapies by Engaging iNKT and NK Cells. *Front Immunol*. 2020;11:873.
126. Tabellini G, Benassi M, Marcenaro E, Coltrini D, Patrizi O, Ricotta D, et al. Primitive neuroectodermal tumor in an ovarian cystic teratoma: natural killer and neuroblastoma cell analysis. *Case Rep Oncol*. 2014;7(1):70-8.

127. Bottino C, Dondero A, Bellora F, Moretta L, Locatelli F, Pistoia V, et al. Natural killer cells and neuroblastoma: tumor recognition, escape mechanisms, and possible novel immunotherapeutic approaches. *Front Immunol*. 2014;5:56.
128. Melaiu O, Chierici M, Lucarini V, Jurman G, Conti LA, De Vito R, et al. Cellular and gene signatures of tumor-infiltrating dendritic cells and natural-killer cells predict prognosis of neuroblastoma. *Nat Commun*. 2020;11(1):5992.
129. Paczulla AM, Rothfelder K, Raffel S, Konantz M, Steinbacher J, Wang H, et al. Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion. *Nature*. 2019;572(7768):254-9.
130. Bommarito D, Martin A, Forcade E, Nastke MD, Ritz J, Bellucci R. Enhancement of tumor cell susceptibility to natural killer cell activity through inhibition of the PI3K signaling pathway. *Cancer Immunol Immunother*. 2016;65(3):355-66.
131. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*. 2007;109(9):3812-9.
132. Bugide S, Janostiak R, Wajapeyee N. Epigenetic Mechanisms Dictating Eradication of Cancer by Natural Killer Cells. *Trends Cancer*. 2018;4(8):553-66.
133. Keppel MP, Saucier N, Mah AY, Vogel TP, Cooper MA. Activation-specific metabolic requirements for NK Cell IFN- γ production. *J Immunol*. 2015;194(4):1954-62.
134. Kwon HJ, Choi GE, Ryu S, Kwon SJ, Kim SC, Booth C, et al. Stepwise phosphorylation of p65 promotes NF- κ B activation and NK cell responses during target cell recognition. *Nat Commun*. 2016;7:11686.
135. Selvarajan V, Osato M, Nah GSS, Yan J, Chung TH, Voon DC, et al. RUNX3 is oncogenic in natural killer/T-cell lymphoma and is transcriptionally regulated by MYC. *Leukemia*. 2017;31(10):2219-27.
136. Textor S, Fiegler N, Arnold A, Porgador A, Hofmann TG, Cerwenka A. Human NK cells are alerted to induction of p53 in cancer cells by upregulation of the NKG2D ligands ULBP1 and ULBP2. *Cancer Res*. 2011;71(18):5998-6009.
137. Kortlever RM, Sodir NM, Wilson CH, Burkhart DL, Pellegrinet L, Brown Swigart L, et al. Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression. *Cell*. 2017;171(6):1301-15.e14.
138. Spranger S, Gajewski TF. Impact of oncogenic pathways on evasion of antitumour immune responses. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(3):139-47.
139. Horvath CM. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci*. 2000;25(10):496-502.
140. Bedel R, Thiery-Vuillemin A, Grandclement C, Balland J, Remy-Martin JP, Kantelip B, et al. Novel role for STAT3 in transcriptional regulation of NK immune cell targeting receptor MICA on cancer cells. *Cancer Res*. 2011;71(5):1615-26.
141. Eckelhart E, Warsch W, Zebedin E, Simma O, Stoiber D, Kolbe T, et al. A novel Ncr1-Cre mouse reveals the essential role of STAT5 for NK-cell survival and development. *Blood*. 2011;117(5):1565-73.
142. Yin J, Leavenworth JW, Li Y, Luo Q, Xie H, Liu X, et al. Ezh2 regulates differentiation and function of natural killer cells through histone methyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(52):15988-93.

143. Zhao D, Zhang Q, Liu Y, Li X, Zhao K, Ding Y, et al. H3K4me3 Demethylase Kdm5a Is Required for NK Cell Activation by Associating with p50 to Suppress SOCS1. *Cell Rep.* 2016;15(2):288-99.
144. Smith V, Foster J. High-Risk Neuroblastoma Treatment Review. *Children (Basel).* 2018;5(9).
145. Pinto NR, Applebaum MA, Volchenbom SL, Matthay KK, London WB, Ambros PF, et al. Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(27):3008-17.
146. Huang M, Weiss WA. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(10):a014415.
147. Illendula A, Fultang N, Peethambaran B. Retinoic acid induces differentiation in neuroblastoma via ROR1 by modulating retinoic acid response elements. *Oncol Rep.* 2020;44(3):1013-24.
148. Zhang J, Yang C, Wu C, Cui W, Wang L. DNA Methyltransferases in Cancer: Biology, Paradox, Aberrations, and Targeted Therapy. *Cancers (Basel).* 2020;12(8).
149. Qiu YY, Mirkin BL, Dwivedi RS. Inhibition of DNA methyltransferase reverses cisplatin induced drug resistance in murine neuroblastoma cells. *Cancer Detect Prev.* 2005;29(5):456-63.
150. Charlet J, Schnekenburger M, Brown KW, Diederich M. DNA demethylation increases sensitivity of neuroblastoma cells to chemotherapeutic drugs. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(7):858-65.
151. Zafar A, Wang W, Liu G, Wang X, Xian W, McKeon F, et al. Molecular targeting therapies for neuroblastoma: Progress and challenges. *Med Res Rev.* 2021;41(2):961-1021.
152. George RE, Lahti JM, Adamson PC, Zhu K, Finkelstein D, Ingle AM, et al. Phase I study of decitabine with doxorubicin and cyclophosphamide in children with neuroblastoma and other solid tumors: a Children's Oncology Group study. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;55(4):629-38.
153. Stone ML, Chiappinelli KB, Li H, Murphy LM, Travers ME, Topper MJ, et al. Epigenetic therapy activates type I interferon signaling in murine ovarian cancer to reduce immunosuppression and tumor burden. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(51):E10981-e90.
154. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell.* 2010;18(6):553-67.
155. Stockhausen MT, Sjölund J, Manetopoulos C, Axelson H. Effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on Notch signalling in human neuroblastoma cells. *Br J Cancer.* 2005;92(4):751-9.
156. De los Santos M, Zambrano A, Aranda A. Combined effects of retinoic acid and histone deacetylase inhibitors on human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(4):1425-32.
157. Wu JC, Jiang HM, Yang XH, Zheng HC. ING5-mediated antineuroblastoma effects of suberoylanilide hydroxamic acid. *Cancer Med.* 2018;7(9):4554-69.
158. DuBois SG, Granger MM, Groshen S, Tsao-Wei D, Ji L, Shamirian A, et al. Randomized Phase II Trial of MIBG Versus MIBG, Vincristine, and Irinotecan Versus MIBG and Vorinostat for Patients With Relapsed or Refractory Neuroblastoma: A Report From NANT Consortium. *J Clin Oncol.* 2021;39(31):3506-14.
159. Nguyen R, Houston J, Chan WK, Finkelstein D, Dyer MA. The role of interleukin-2, all-trans retinoic acid, and natural killer cells: surveillance mechanisms in anti-GD2 antibody therapy in neuroblastoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67(4):615-26.

160. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, et al. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010;363(14):1324-34.
161. Armideo E, Callahan C, Madonia L. Immunotherapy for High-Risk Neuroblastoma: Management of Side Effects and Complications. *J Adv Pract Oncol*. 2017;8(1):44-55.
162. Anderson J, Majzner RG, Sondel PM. Immunotherapy of Neuroblastoma: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res*. 2022.
163. Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD, et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood*. 2011;118(23):6050-6.
164. Heczey A, Louis CU, Savoldo B, Dakhova O, Durett A, Grilley B, et al. CAR T Cells Administered in Combination with Lymphodepletion and PD-1 Inhibition to Patients with Neuroblastoma. *Mol Ther*. 2017;25(9):2214-24.
165. Modak S, Kramer K, Gultekin SH, Guo HF, Cheung NK. Monoclonal antibody 8H9 targets a novel cell surface antigen expressed by a wide spectrum of human solid tumors. *Cancer Res*. 2001;61(10):4048-54.
166. Richards RM, Sotillo E, Majzner RG. CAR T Cell Therapy for Neuroblastoma. *Front Immunol*. 2018;9:2380.
167. Aravindan N, Jain D, Somasundaram DB, Herman TS, Aravindan S. Cancer stem cells in neuroblastoma therapy resistance. *Cancer Drug Resist*. 2019;2(4):948-67.
168. Vangipuram SD, Wang ZJ, Lyman WD. Resistance of stem-like cells from neuroblastoma cell lines to commonly used chemotherapeutic agents. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54(3):361-8.
169. Khalil MA, Hrabeta J, Cipro S, Stiborova M, Vicha A, Eckschlager T. Neuroblastoma stem cells - mechanisms of chemoresistance and histone deacetylase inhibitors. *Neoplasma*. 2012;59(6):737-46.
170. Dean M. Cancer stem cells: Implications for cancer causation and therapy resistance. *Discov Med*. 2005;5(27):278-82.
171. Santana VM, Furman WL, McGregor LM, Billups CA. Disease control intervals in high-risk neuroblastoma. *Cancer*. 2008;112(12):2796-801.
172. Laverdière C, Cheung NK, Kushner BH, Kramer K, Modak S, LaQuaglia MP, et al. Long-term complications in survivors of advanced stage neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2005;45(3):324-32.
173. Cohen LE, Gordon JH, Popovsky EY, Gunawardene S, Duffey-Lind E, Lehmann LE, et al. Late effects in children treated with intensive multimodal therapy for high-risk neuroblastoma: high incidence of endocrine and growth problems. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(4):502-8.
174. Bassani B, Baci D, Gallazzi M, Poggi A, Bruno A, Mortara L. Natural Killer Cells as Key Players of Tumor Progression and Angiogenesis: Old and Novel Tools to Divert Their Pro-Tumor Activities into Potent Anti-Tumor Effects. *Cancers (Basel)*. 2019;11(4).
175. Shaffer BC, Le Luduec JB, Forlenza C, Jakubowski AA, Perales MA, Young JW, et al. Phase II Study of Haploidentical Natural Killer Cell Infusion for Treatment of Relapsed or Persistent Myeloid Malignancies Following Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(4):705-9.
176. Lupo KB, Matosevic S. Natural Killer Cells as Allogeneic Effectors in Adoptive Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2019;11(6).

177. Liu E, Marin D, Banerjee P, Macapinlac HA, Thompson P, Basar R, et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med.* 2020;382(6):545-53.
178. Esser R, Müller T, Stefes D, Kloess S, Seidel D, Gillies SD, et al. NK cells engineered to express a GD2 -specific antigen receptor display built-in ADCC-like activity against tumour cells of neuroectodermal origin. *J Cell Mol Med.* 2012;16(3):569-81.
179. Xie G, Dong H, Liang Y, Ham JD, Rizwan R, Chen J. CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer. *EBioMedicine.* 2020;59:102975.
180. Lagrue K, Carisey A, Morgan DJ, Chopra R, Davis DM. Lenalidomide augments actin remodeling and lowers NK-cell activation thresholds. *Blood.* 2015;126(1):50-60.
181. Fionda C, Abruzzese MP, Zingoni A, Cecere F, Vulpis E, Peruzzi G, et al. The IMiDs targets IKZF-1/3 and IRF4 as novel negative regulators of NK cell-activating ligands expression in multiple myeloma. *Oncotarget.* 2015;6(27):23609-30.
182. Wu X, Tao Y, Hou J, Meng X, Shi J. Valproic acid upregulates NKG2D ligand expression through an ERK-dependent mechanism and potentially enhances NK cell-mediated lysis of myeloma. *Neoplasia.* 2012;14(12):1178-89.
183. Benson DM, Jr., Bakan CE, Mishra A, Hofmeister CC, Efebera Y, Becknell B, et al. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood.* 2010;116(13):2286-94.
184. Wiesmayr S, Webber SA, Macedo C, Popescu I, Smith L, Luce J, et al. Decreased Nkp46 and NKG2D and elevated PD-1 are associated with altered NK-cell function in pediatric transplant patients with PTL. *Eur J Immunol.* 2012;42(2):541-50.
185. Zhang Q, Bi J, Zheng X, Chen Y, Wang H, Wu W, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat Immunol.* 2018;19(7):723-32.
186. Tang X, Yang L, Li Z, Nalin AP, Dai H, Xu T, et al. First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Am J Cancer Res.* 2018;8(6):1083-9.
187. Chou CK, Turtle CJ. Insight into mechanisms associated with cytokine release syndrome and neurotoxicity after CD19 CAR-T cell immunotherapy. *Bone Marrow Transplant.* 2019;54(Suppl 2):780-4.
188. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci.* 2018;14(4):910-9.
189. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(10):839-45.
190. Thongsin N, Wattanapanitch M. A three-dimensional immune-oncology model for studying in vitro primary human NK cell cytotoxic activity. *PLoS One.* 2022;17(3):e0264366.
191. Storch K, Eke I, Borgmann K, Krause M, Richter C, Becker K, et al. Three-dimensional cell growth confers radioresistance by chromatin density modification. *Cancer Res.* 2010;70(10):3925-34.
192. Ghosh S, Spagnoli GC, Martin I, Ploegert S, Demougin P, Heberer M, et al. Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study. *J Cell Physiol.* 2005;204(2):522-31.

193. Corallo D, Frabetti S, Candini O, Gregianin E, Dominici M, Fischer H, et al. Emerging Neuroblastoma 3D In Vitro Models for Pre-Clinical Assessments. *Front Immunol.* 2020;11:584214.
194. Fife CM, Sagnella SM, Teo WS, Po'uha ST, Byrne FL, Yeap YY, et al. Stathmin mediates neuroblastoma metastasis in a tubulin-independent manner via RhoA/ROCK signaling and enhanced transendothelial migration. *Oncogene.* 2017;36(4):501-11.
195. Vrenken KS, Vervoort BMT, van Ingen Schenau DS, Derks YHW, van Emst L, Grytsenko PG, et al. The transcriptional repressor SNAI2 impairs neuroblastoma differentiation and inhibits response to retinoic acid therapy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(3):165644.
196. Lee SY, Teng Y, Son M, Ku B, Hwang HJ, Tergaonkar V, et al. Three-Dimensional Aggregated Spheroid Model of Hepatocellular Carcinoma Using a 96-Pillar/Well Plate. *Molecules.* 2021;26(16).
197. Sebens S, Schafer H. The tumor stroma as mediator of drug resistance--a potential target to improve cancer therapy? *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(11):2259-72.
198. Valkenburg KC, de Groot AE, Pienta KJ. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(6):366-81.
199. Barton J, Pacey K, Jain N, Kasia T, Edwards D, Thevanesan C, et al. Establishment and phenotyping of neurosphere cultures from primary neuroblastoma samples. *F1000Res.* 2019;8:823.
200. Clevers H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell.* 2016;165(7):1586-97.
201. Sachs N, de Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F, et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell.* 2018;172(1-2):373-86.e10.
202. Dowling P, Clynes M. Conditioned media from cell lines: a complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers. *Proteomics.* 2011;11(4):794-804.
203. Daneshmandi L, Shah S, Jafari T, Bhattacharjee M, Momah D, Saveh-Shemshaki N, et al. Emergence of the Stem Cell Secretome in Regenerative Engineering. *Trends Biotechnol.* 2020;38(12):1373-84.
204. Kim YJ, Ahn HJ, Lee SH, Lee MH, Kang KS. Effects of conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in the skin immune response. *Biomed Pharmacother.* 2020;131:110789.
205. Gwam C, Mohammed N, Ma X. Stem cell secretome, regeneration, and clinical translation: a narrative review. *Ann Transl Med.* 2021;9(1):70.
206. Cesarz Z, Tamama K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9176357.
207. Xu Y, Sun J, Sheard MA, Tran HC, Wan Z, Liu WY, et al. Lenalidomide overcomes suppression of human natural killer cell anti-tumor functions by neuroblastoma microenvironment-associated IL-6 and TGF β 1. *Cancer Immunol Immunother.* 2013;62(10):1637-48.
208. Moffat JG, Rudolph J, Bailey D. Phenotypic screening in cancer drug discovery - past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(8):588-602.
209. Moffat JG, Vincent F, Lee JA, Eder J, Prunotto M. Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: an industry perspective. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(8):531-43.
210. Kondo J, Inoue M. Application of Cancer Organoid Model for Drug Screening and Personalized Therapy. *Cells.* 2019;8(5).

211. Wilkinson GF, Pritchard K. In vitro screening for drug repositioning. *J Biomol Screen.* 2015;20(2):167-79.
212. Issa NT, Stathias V, Schürer S, Dakshanamurthy S. Machine and deep learning approaches for cancer drug repurposing. *Semin Cancer Biol.* 2021;68:132-42.
213. Tsutsumimoto T, Williams P, Yoneda T. The SK-N-AS human neuroblastoma cell line develops osteolytic bone metastases with increased angiogenesis and COX-2 expression. *J Bone Oncol.* 2014;3(3-4):67-76.
214. Milde T, Oehme I, Korshunov A, Kopp-Schneider A, Remke M, Northcott P, et al. HDAC5 and HDAC9 in medulloblastoma: novel markers for risk stratification and role in tumor cell growth. *Clin Cancer Res.* 2010;16(12):3240-52.
215. Ridinger J, Koeneke E, Kolbinger FR, Koerholz K, Mahboobi S, Hellweg L, et al. Dual role of HDAC10 in lysosomal exocytosis and DNA repair promotes neuroblastoma chemoresistance. *Sci Rep.* 2018;8(1):10039.
216. Lobo J, Guimarães-Teixeira C, Barros-Silva D, Miranda-Gonçalves V, Camilo V, Guimarães R, et al. Efficacy of HDAC Inhibitors Belinostat and Panobinostat against Cisplatin-Sensitive and Cisplatin-Resistant Testicular Germ Cell Tumors. *Cancers (Basel).* 2020;12(10).
217. Lawrence TS, Beers WH, Gilula NB. Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. *Nature.* 1978;272(5653):501-6.
218. Paschos NK, Brown WE, Eswaramoorthy R, Hu JC, Athanasiou KA. Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015;9(5):488-503.
219. Usman S, Waseem NH, Nguyen TKN, Mohsin S, Jamal A, Teh MT, et al. Vimentin Is at the Heart of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Mediated Metastasis. *Cancers (Basel).* 2021;13(19).
220. Li H, Wang C, Lan L, Behrens A, Tomaschko M, Ruiz J, et al. High expression of vinculin predicts poor prognosis and distant metastasis and associates with influencing tumor-associated NK cell infiltration and epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *Aging (Albany NY).* 2021;13(4):5197-225.
221. Metzger W, Rother S, Pohlemann T, Möller S, Schnabelrauch M, Hintze V, et al. Evaluation of cell-surface interaction using a 3D spheroid cell culture model on artificial extracellular matrices. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;73:310-8.
222. Zhang P, Sun Y, Ma L. ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle.* 2015;14(4):481-7.
223. Fratini L, Jaeger M, de Farias CB, Brunetto AT, Brunetto AL, Shaw L, et al. Oncogenic functions of ZEB1 in pediatric solid cancers: interplays with microRNAs and long noncoding RNAs. *Mol Cell Biochem.* 2021;476(11):4107-16.
224. Klein CA. Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(11):681-94.
225. Riffle S, Hegde RS. Modeling tumor cell adaptations to hypoxia in multicellular tumor spheroids. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1):102.
226. Gautier M, Thirant C, Delattre O, Janoueix-Lerosey I. Plasticity in Neuroblastoma Cell Identity Defines a Noradrenergic-to-Mesenchymal Transition (NMT). *Cancers (Basel).* 2021;13(12).
227. Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol.* 2010;28(10):1069-78.

228. Paul S, Lal G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2017;8:1124.
229. Sarrieau A, Laburthe M, Rosselin G. Intestinal VIP receptors: differential effect of trypsin on the high and low affinity binding sites. *Mol Cell Endocrinol.* 1983;31(2-3):301-13.
230. Huang HL, Hsing HW, Lai TC, Chen YW, Lee TR, Chan HT, et al. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J Biomed Sci.* 2010;17(1):36.
231. Osswald A, Hedrich V, Sommergruber W. 3D-3 Tumor Models in Drug Discovery for Analysis of Immune Cell Infiltration. *Methods Mol Biol.* 2019;1953:151-62.
232. Augustine TN. Analysis of Immune-Tumor Cell Interactions Using a 3D Co-culture Model. *Methods Mol Biol.* 2020;2184:103-10.
233. Temples MN, Adjei IM, Nimocks PM, Djeu J, Sharma B. Engineered Three-Dimensional Tumor Models to Study Natural Killer Cell Suppression. *ACS Biomater Sci Eng.* 2020;6(7):4179-99.
234. Särchen V, Shanmugalingam S, Kehr S, Reindl LM, Greze V, Wiedemann S, et al. Pediatric multicellular tumor spheroid models illustrate a therapeutic potential by combining BH3 mimetics with Natural Killer (NK) cell-based immunotherapy. *Cell Death Discov.* 2022;8(1):11.
235. Ciechomska IA, Przanowski P, Jackl J, Wojtas B, Kaminska B. BIX01294, an inhibitor of histone methyltransferase, induces autophagy-dependent differentiation of glioma stem-like cells. *Sci Rep.* 2016;6:38723.
236. Oh SY, Seok JY, Choi YS, Lee SH, Bae JS, Lee YM. The Histone Methyltransferase Inhibitor BIX01294 Inhibits HIF-1 α Stability and Angiogenesis. *Mol Cells.* 2015;38(6):528-34.
237. Sun N, Zhang J, Zhang C, Zhao B, Jiao A. DNMTs inhibitor SGI-1027 induces apoptosis in Huh7 human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett.* 2018;16(5):5799-806.
238. Penter L, Maier B, Frede U, Hackner B, Carell T, Hagemeyer C, et al. A rapid screening system evaluates novel inhibitors of DNA methylation and suggests F-box proteins as potential therapeutic targets for high-risk neuroblastoma. *Target Oncol.* 2015;10(4):523-33.
239. Haddach M, Michaux J, Schwaebe MK, Pierre F, O'Brien SE, Borsan C, et al. Discovery of CX-6258. A Potent, Selective, and Orally Efficacious pan-Pim Kinases Inhibitor. *ACS Med Chem Lett.* 2012;3(2):135-9.
240. Sun Z, Zeng L, Zhang M, Zhang Y, Yang N. PIM1 inhibitor synergizes the anti-tumor effect of osimertinib via STAT3 dephosphorylation in EGFR-mutant non-small cell lung cancer. *Ann Transl Med.* 2020;8(6):366.
241. Zhang X, Lu H, Hong W, Liu L, Wang S, Zhou M, et al. Tyrphostin B42 attenuates trichostatin A-mediated resistance in pancreatic cancer cells by antagonizing IL-6/JAK2/STAT3 signaling. *Oncol Rep.* 2018;39(4):1892-900.
242. Kang YJ, Jeung IC, Park A, Park YJ, Jung H, Kim TD, et al. An increased level of IL-6 suppresses NK cell activity in peritoneal fluid of patients with endometriosis via regulation of SHP-2 expression. *Hum Reprod.* 2014;29(10):2176-89.
243. Briere D, Sudhakar N, Woods DM, Hallin J, Engstrom LD, Aranda R, et al. The class I/IV HDAC inhibitor mocetinostat increases tumor antigen presentation, decreases immune suppressive cell types and augments checkpoint inhibitor therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67(3):381-92.
244. Grivas P, Mortazavi A, Picus J, Hahn NM, Milowsky MI, Hart LL, et al. Mocetinostat for patients with previously treated, locally advanced/metastatic urothelial carcinoma and inactivating alterations of acetyltransferase genes. *Cancer.* 2019;125(4):533-40.

245. Qiu T, Zhou L, Zhu W, Wang T, Wang J, Shu Y, et al. Effects of treatment with histone deacetylase inhibitors in solid tumors: a review based on 30 clinical trials. *Future Oncol.* 2013;9(2):255-69.
246. Shi H, Han L, Zhao J, Wang K, Xu M, Shi J, et al. Tumor stemness and immune infiltration synergistically predict response of radiotherapy or immunotherapy and relapse in lung adenocarcinoma. *Cancer Med.* 2021;10(24):8944-60.
247. Afolabi LO, Bi J, Li X, Adeshakin AO, Adeshakin FO, Wu H, et al. Synergistic Tumor Cytolysis by NK Cells in Combination With a Pan-HDAC Inhibitor, Panobinostat. *Front Immunol.* 2021;12:701671.
248. Körholz K, Ridinger J, Krunic D, Najafi S, Gerloff XF, Frese K, et al. Broad-Spectrum HDAC Inhibitors Promote Autophagy through FOXO Transcription Factors in Neuroblastoma. *Cells.* 2021;10(5).
249. Xiao L, Somers K, Murray J, Pandher R, Karsa M, Ronca E, et al. Dual Targeting of Chromatin Stability By The Curaxin CBL0137 and Histone Deacetylase Inhibitor Panobinostat Shows Significant Preclinical Efficacy in Neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2021;27(15):4338-52.
250. Wang G, Edwards H, Caldwell JT, Buck SA, Qing WY, Taub JW, et al. Panobinostat synergistically enhances the cytotoxic effects of cisplatin, doxorubicin or etoposide on high-risk neuroblastoma cells. *PLoS One.* 2013;8(9):e76662.
251. Bowen KA, Chung DH. Recent advances in neuroblastoma. *Curr Opin Pediatr.* 2009;21(3):350-6.
252. Iwakura H, Ariyasu H, Kanamoto N, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K, et al. Establishment of a novel neuroblastoma mouse model. *Int J Oncol.* 2008;33(6):1195-9.

Annexes

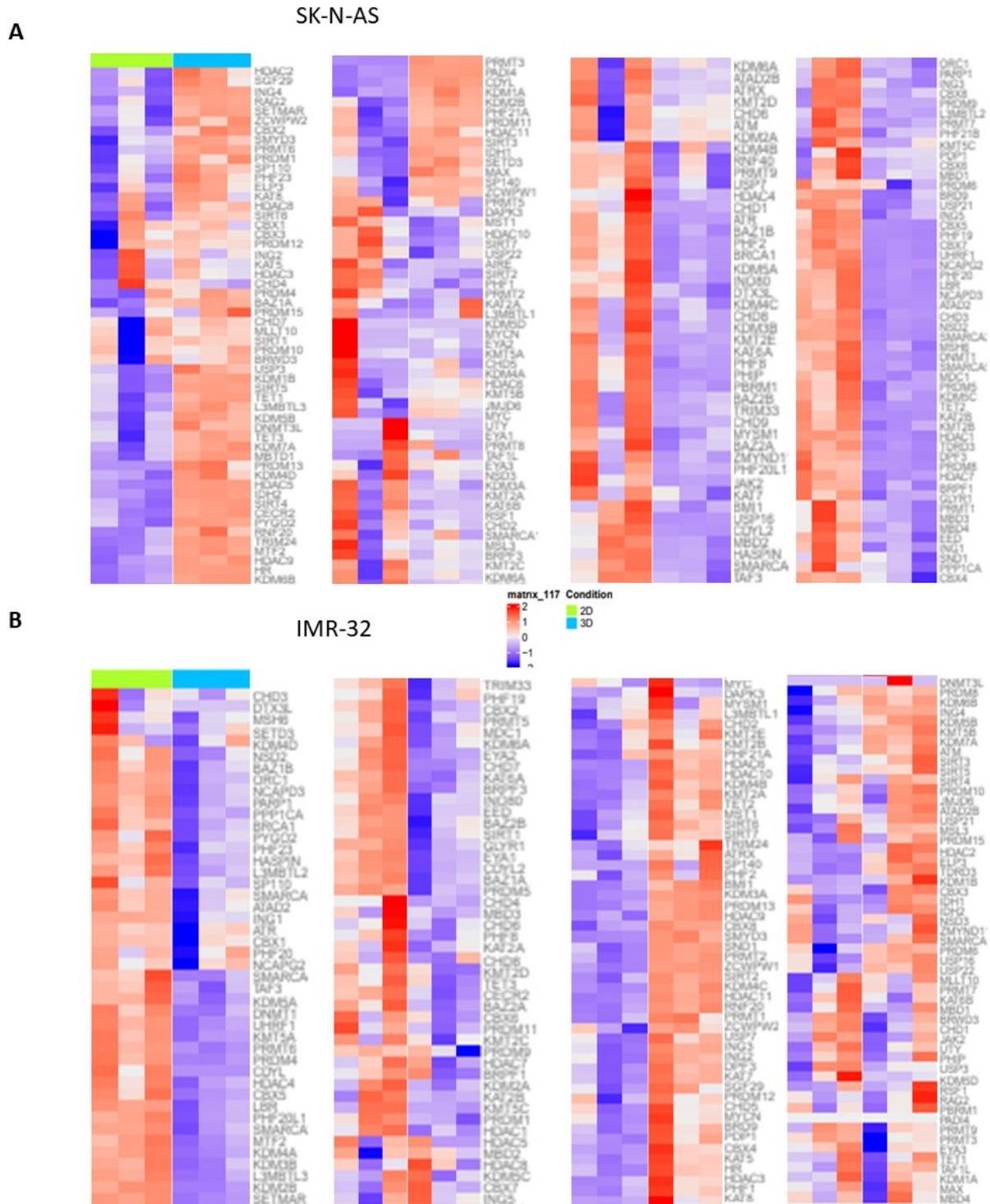
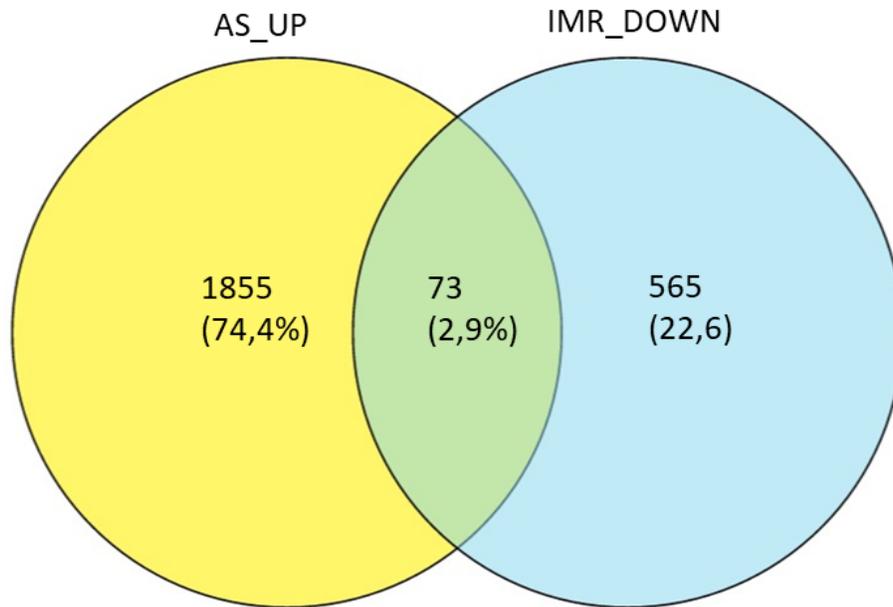


Figure 1. Analyse différentielle du profil d'expression de plusieurs gènes impliqués dans la

méthylation et l'acétylation dans les lignées de neuroblastome SK-N-AS et IMR-32 en 2D comparativement au 3D à 24 jour de culture. A. Heatmap de l'expression différentielle des gènes entre le 2D et le 3D à 24 jour de culture dans la lignée SK-N-AS. **B.** Heatmap de l'expression différentielle des gènes entre le 2D et le 3D à 24 jours de culture dans la lignée IMR-32. Les gènes n'ont pas été triés selon la valeur de *P* ni du log2foldchange.

A



B

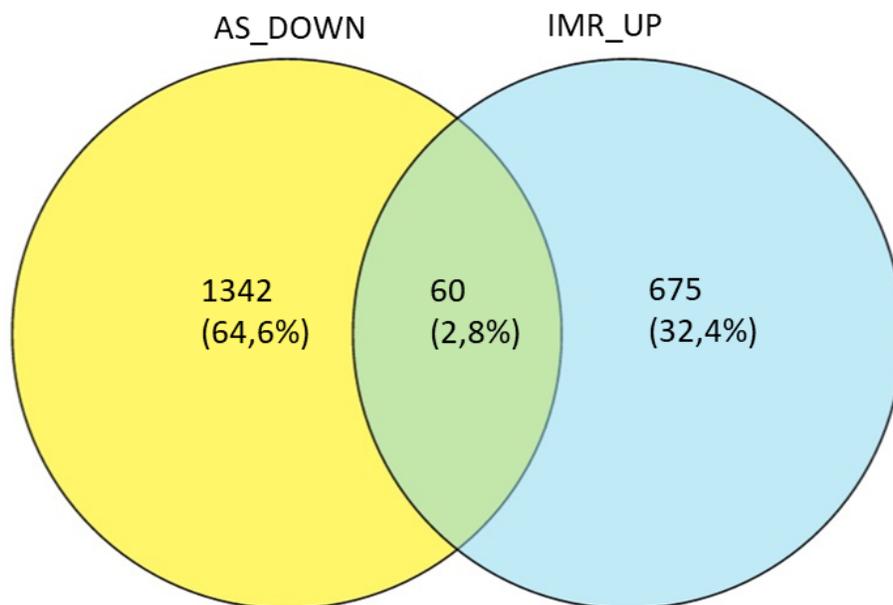


Figure 2. **Analyse différentielle de l'expression des gènes entre la culture 2D et 3D au jours 24 dans les lignées SK-N-AS et IMR-32. A.** Similarité des gènes surexprimés des SK-N-AS et sous exprimés des IMR-32 en 3D représentés sous la forme d'un diagramme de Venn. **B.** Similarité des gènes surexprimés des IMR-32 et sous exprimés des SK-N-AS en 3D représentés sous la forme d'un diagramme de Venn.

Tableau 5. – Caractéristiques des 181 composés de la librairie épigénétique

Product Name	Information	Pathway	Target
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.	DNA Damage	PARP
Roxadustat (FG-4592)	FG-4592 is an HIF α prolyl hydroxylase inhibitor, stabilizes HIF-2 and induces EPO production. Phase 2/3.	Angiogenesis	HIF
Panobinostat (LBH589)	Panobinostat (LBH589) is a novel broad-spectrum HDAC inhibitor with IC50 of 5 nM. Phase 3.	Epigenetics	HDAC
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.	Others	HDAC
Vorinostat (SAHA, MK0683)	Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) is an HDAC inhibitor with IC50 of ~10 nM.	Endocrinology & Hormones	Autophagy,HDAC
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	Endocrinology & Hormones	Aurora Kinase

	Aurora A than 55 other kinases. Phase 2.		
Entinostat (MS-275)	Entinostat (MS-275) strongly inhibits HDAC1 and HDAC3 with IC50 of 0.51 μ M and 1.7 μ M, compared with HDACs 4, 6, 8, and 10. Phase 1/2.	Transmembrane Transporters	HDAC
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.	Protein Tyrosine Kinase	PARP
Belinostat (PXD101)	Belinostat (PXD101) is a novel HDAC inhibitor with IC50 of 27 nM, with activity demonstrated in cisplatin-resistant tumors. Phase 1/2.	Others	HDAC
Iniparib (BSI-201)	BSI-201 (Iniparib, SAR240550) is a PARP1 inhibitor with demonstrated effectiveness in triple-negative breast cancer (TNBC). Phase 3.	Others	PARP
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.	Others	HDAC
Dacinostat (LAQ824)	LAQ824 (Dacinostat) is a novel HDAC inhibitor with IC50 of 32 nM and is known to activate the p21 promoter.	Others	HDAC
Quisinostat (JNJ-26481585) 2HCI	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	Others	HDAC

	HDACs 3, 5, 8, and 9 and lowest potency to HDACs 6 and 7. Phase 2.		
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.	Others	PARP
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 Aurora B. Phase 1.	Others	Aurora Kinase
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.	Others	Aurora Kinase
Danusertib (PHA-739358)	Danusertib (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.	Others	Aurora Kinase, Bcr-Abl, c-RET, FGFR
Mocetinostat (MGCD0103)	Mocetinostat (MGCD0103) is a potent HDAC inhibitor with most potency for HDAC1 with IC50 of 0.15 μM, 2- to 10- fold selectivity against HDAC2, 3, and 11, and no activity to HDAC4, 5, 6, 7, and 8. Phase 1/2.	Others	HDAC

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.	Others	Sirtuin
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.	Others	PARP
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.	Others	Aurora Kinase
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.	Others	Aurora Kinase, Bcr-Abl, JAK
AG-490 (Tyrphostin B42)	AG-490 (Tyrphostin B42) is an inhibitor of EGFR with IC50 of 0.1 μ M, 135-fold more selective for EGFR versus ErbB2, also inhibits JAK2 with no activity to Lck, Lyn, Btk, Syk and Src.	Others	EGFR, JAK
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.	Others	Aurora Kinase
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.	Others	Aurora Kinase
Valproic acid sodium salt (Sodium valproate)	Valproic acid sodium salt (Sodium valproate) is a HDAC inhibitor	Neuronal Signaling	GABA Receptor, HDAC, Autophagy

		with IC50 of 0.4 mM and also inhibits GABA-transaminase or succinic semialdehyde dehydrogenase.		
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.	Cell Cycle	Aurora Kinase,VEGFR
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.	Angiogenesis	Aurora Kinase,FLT3,VEGFR
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.	Epigenetics	EGFR,HDAC,HER2
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.	Epigenetics	DNA Methyltransferase
PFI-1 (PF-6405761)		PFI-1 is a selective BET (bromodomain-containing protein) inhibitor for BRD4 with IC50 of 0.22 μ M.	Epigenetics	Epigenetic Reader Domain
2-Methoxyestradiol (2-MeOE2)		2-Methoxyestradiol depolymerizes microtubules and blocks HIF-1 α nuclear accumulation and HIF-	Angiogenesis	HIF

	transcriptional activity. Phase 2.		
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.	Cell Cycle	Aurora Kinase,CDK
Ellagic acid	Ellagic acid has antiproliferative and antioxidant property.	DNA Damage	Topoisomerase
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/STAT	JAK
Pirarubicin	Pirarubicin is an anthracycline antibiotic, and also a DNA/RNA synthesis inhibitor by intercalating into DNA and interacts with topoisomerase II, used as an antineoplastic agent.	DNA Damage	Topoisomerase
Resveratrol	Resveratrol is a phytoalexin produced naturally by several plants with anti-cancer, anti-inflammatory, blood-sugar-lowering and other beneficial cardiovascular effects.	Epigenetics	Autophagy,Sirtuin
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.	Cytoskeletal Signaling	HDAC
Aurora A Inhibitor I	Aurora A Inhibitor I is a novel, potent, and selective inhibitor of	Cell Cycle	Aurora Kinase

	Aurora A with IC50 of 3.4 nM. It is 1000-fold more selective for Aurora A than Aurora B.		
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, STLK2, and VEGFR2/3.	Cell Cycle	Aurora Kinase
Ofloxacin	Ofloxacin is a synthetic broad-spectrum antimicrobial agent.	DNA Damage	Topoisomerase
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.	Cytoskeletal Signaling	HDAC
Norfloxacin	Norfloxacin is a broad-spectrum antibiotic.	DNA Damage	Topoisomerase
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 SIRT I. Phase 2.	Cytoskeletal Signaling	HDAC
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 in vivo.	Cell Cycle	Aurora Kinase
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.	Epigenetics	Sirtuin
Azacitidine	Azacitidine is a nucleoside analogue of cytidine that specifically inhibits DNA methylation by trapping DNA methyltransferases.	DNA Damage	DNA Methyltransferase

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, and 10.	Epigenetics	HDAC
ENMD-2076 L-(+)-Tartaric acid	ENMD-2076 L-(+)-Tartaric acid is the 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.	Angiogenesis	Aurora Kinase,FLT3,VEGFR
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.	Angiogenesis	Aurora Kinase,Bcr-Abl,FLT3
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/STAT	JAK
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.	Cytoskeletal Signaling	HDAC
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.	DNA Damage	PARP
Gandotinib (LY2784544)	LY2784544 is a potent JAK2 inhibitor with IC50 of 3 nM, effective	JAK/STAT	JAK

	in JAK2V617F, 8- and 20-fold selective versus JAK1 and JAK3. Phase 2.		
SGI-1776 free base	SGI-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.	JAK/STAT	Pim
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/STAT	JAK
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/STAT	JAK
AR-42	AR-42 is an HDAC inhibitor with IC50 of 30 nM. Phase 1.	Epigenetics	HDAC
Quercetin	Quercetin is a natural flavonoid present in vegetables, fruit and wine and is a PI3K inhibitor with IC50 of 2.4 – 5.4 μ M.	Epigenetics	Src,Sirtuin,PKC,PI3K
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.	DNA Damage	PKA,EGFR,PKC
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).	Epigenetics	HDAC
NVP-BSK805 2HCl	NVP-BSK805 is a potent and selective ATP-competitive JAK2	JAK/STAT	JAK

	inhibitor with IC50 of 0.5 nM, >20-fold selectivity towards JAK1, JAK3 and TYK2.		
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.	JAK/STAT	c-RET,FLT3,JAK
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.	Epigenetics	HDAC
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.	Cell Cycle	Aurora Kinase
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.	Cell Cycle	Aurora Kinase
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/STAT	JAK
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	Cell Cycle	Aurora Kinase

	A-TPX2 complex. Phase 1.		
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.	Cytoskeletal Signaling	HDAC,PI3K
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.	Cell Cycle	Aurora Kinase
M344	M344 is a potent HDAC inhibitor with IC50 of 100 nM and able to induce cell differentiation.	Cytoskeletal Signaling	HDAC
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/STAT	JAK
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/STAT	JAK
Sirtinol	Sirtinol is a specific SIRT1 and SIRT2 inhibitor with IC50 of 131 μ M and 38 μ M, respectively.	Epigenetics	Sirtuin
CEP-33779	CEP33779 is a selective JAK2 inhibitor with IC50 of 1.8 nM, >40- and >800-fold versus JAK1 and TYK2.	JAK/STAT	JAK
Tacedinaline (CI994)	CI-994 (Tacedinaline) is an anti-cancer drug which inhibits HDAC1 with IC50 of 0.57 μ M	Epigenetics	HDAC

	and causes G1 cell cycle arrest. Phase 3.		
RG108	RG108 is an inhibitor of DNA methyltransferase with IC50 of 115 nM, does not cause trapping of covalent enzymes.	Epigenetics	DNA Methyltransferase, Transferrase
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.	Epigenetics	JAK
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/STAT	EGFR, JAK
PJ34	PJ-34 is a PARP inhibitor with EC50 of 20 nM and is equally potent to PARP1/2.	DNA Damage	PARP
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/STAT	JAK
IOX2	IOX2 is a potent inhibitor of HIF-1α prolyl hydroxylase-2 (PHD2) with IC50 of 21 nM, >100-fold selectivity over JMJD2A, JMJD2C, JMJD2E, JMJD3, or the 2OG oxygenase FIH.	Angiogenesis	HIF
Clevudine	Clevudine is an antiviral drug for the treatment of hepatitis B.	DNA Damage	DNA/RNA Synthesis
Entacapone	Entacapone inhibits catechol-O-	Epigenetics	Histone Methyltransferase

	methyltransferase(CO MT) with IC50 of 151 nM.		
Sodium Phenylbutyrate	Sodium Phenylbutyrate is a transcriptional regulators that act by altering chromatin structure via the modulation of HDAC activity.	DNA Damage	HDAC
Tranlycypromine HCl (2-PCPA)	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.	Epigenetics	MAO
Procainamide HCl	Procainamide HCl is a sodium channel blocker, and also a DNA methyltransferase inhibitor, used in the treatment of cardiac arrhythmias.	Transmembrane Transporters	DNA Methyltransferase, Sodium Channel
Tofacitinib Citrate (CP-690550)	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/STAT	JAK
AZD2461	AZD2461 is a novel PARP inhibitor with low affinity for Pgp than Olaparib. Phase 1.	DNA Damage	PARP
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/STAT	JAK
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, respectively.	JAK/STAT	Pim

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.	Epigenetics	Histone Methyltransferase
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.	Epigenetics	Histone Demethylase
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.	Epigenetics	Histone Methyltransferase
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.	Epigenetics	Epigenetic Reader Domain
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, respectively. Phase 1.	JAK/STAT	Pim
(+)-JQ1	(+)-JQ1 is a BET bromodomain inhibitor, with IC50 of 77 nM/33 nM for BRD4(1/2), binding to all bromodomains of the	Epigenetics	Epigenetic Reader Domain

	BET family, but not to bromodomains outside the BET family.		
Zebularine	Zebularine is a DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases, also inhibits cytidinedeaminase with Ki of 2 μ M.	Epigenetics	DNA Methyltransferase
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 μ M.	Epigenetics	Histone Methyltransferase
C646	C646 is an inhibitor for histone acetyltransferase, and inhibits p300 with a Ki of 400 nM. Preferentially selective for p300 versus other acetyltransferases.	Epigenetics	Histone Acetyltransferase
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.	Epigenetics	Epigenetic Reader Domain
RGFP966	RGFP966 is an HDAC3 inhibitor with IC50 of 0.08 μ M, exhibits > 200-fold selectivity over other HDAC.	Epigenetics	HDAC
GSK2801	<i>GSK2801 is a selective bromodomains BAZ2A/B inhibitor with K<sub>D</sub> of 257 nM and 136 nM, respectively.</i>	Epigenetics	Epigenetic Reader Domain
Bromosporine	Bromosporine is a broad spectrum inhibitor for	Epigenetics	Epigenetic Reader Domain

	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.		
IOX1	IOX1 is a potent and broad-spectrum inhibitor of 2OG oxygenases, including the JmjC demethylases.	Epigenetics	Histone Demethylase
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, respectively.	Epigenetics	Histone Demethylase
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.	DNA Damage	PARP
SGC-CBP30	SGC-CBP30 is a potent CREBBP/EP300 inhibitor with IC50 of 21 nM and 38 nM, respectively.	Epigenetics	Epigenetic Reader Domain
MM-102	MM-102 is a high-affinity peptidomimetic MLL1 inhibitor with IC50 of 0.4 μ M.	Epigenetics	Histone Methyltransferase
SGI-1027	SGI-1027 is a DNMT inhibitor with IC50 of 6, 8, 7.5 μ M for DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B	Epigenetics	DNA Methyltransferase
JIB-04	<i>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.</i>	Epigenetics	Histone Demethylase

RG2833 (RGFP109)	RG2833 (RGFP109) is a brain penetrant HDAC inhibitor with IC50 of 60 nM and 50 nM for HDAC1 and HDAC3, respectively.	Epigenetics	HDAC
PFI-2 HCl	<i>PFI-2 is a potent, selective, and cell-active lysine methyltransferase SETD7 inhibitor with $K_{i(app)}$ and IC_{50} of 0.33 nM and 2 nM, 1000-fold selectivity over other methyltransferases and other non-epigenetic targets.</i>	Epigenetics	Histone Methyltransferase
RVX-208	RVX-208 is a potent BET bromodomain inhibitor with IC50 of 0.510 μ M for BD2, about 170-fold selectivity over BD1. Phase 2.	Epigenetics	Epigenetic Reader Domain
ML324	<i>ML324 is a selective inhibitor of jumonji histone demethylase (JMJD2) with IC_{50} of 920 nM.</i>	Epigenetics	Histone Demethylase
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.	DNA Damage	PARP
CPI-203	CPI-203 is a potent BET bromodomain inhibitor with IC50 of 37 nM for BRD4.	Epigenetics	Epigenetic Reader Domain
MS436	<i>MS436 is a selective BET bromodomain inhibitor with $K_{i(app)}$ of 0.085 μM and 0.34 μM for BRD4 (1) and BRD4 (2), respectively.</i>	Epigenetics	Epigenetic Reader Domain
PFI-3	<i>PFI-3 is a selective chemical probe for SMARCA bromodomains,</i>	Epigenetics	Epigenetic Reader Domain

	<i>including SMARCA2, SMARCA4 and PB1(5) bromodomains.</i>		
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, respectively.	Epigenetics	HDAC
EPZ004777	EPZ004777 is a potent, selective DOT1L inhibitor with IC50 of 0.4 nM.	Epigenetics	Histone Methyltransferase
OTX015	OTX015 is a potent BET bromodomain inhibitor with EC50 ranging from 10 to 19 nM for BRD2, BRD3, and BRD4. Phase 1.	Epigenetics	Epigenetic Reader Domain
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.	Epigenetics	Epigenetic Reader Domain
ME0328	ME0328 is a potent and selective PARP inhibitor with IC50 of 0.89 µM for PARP3, about 7-fold selectivity over PARP1.	Epigenetics	PARP
Nexturastat A	Nexturastat A is a potent and selective HDAC6 inhibitor with IC50 of 5 nM, >190-fold selectivity over other HDACs.	Epigenetics	HDAC
MG149	<i>MG149 is a potent histone acetyltransferase inhibitor with IC50 of 74 µM and 47 µM for Tip60 and MOF, respectively.</i>	Epigenetics	Histone Acetyltransferase
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	JAK/STAT	JAK

	TYK2, respectively. Phase 2/3.		
4SC-202	<i>4SC-202 is a selective class I HDAC inhibitor with IC50 of 1.20 μM, 1.12 μM, and 0.57 μM for HDAC1, HDAC2, and HDAC3, respectively. Also displays inhibitory activity against Lysine specific demethylase 1 (LSD1).</i> Phase 1.	Epigenetics	HDAC
UNC0379	<i>UNC0379 is a selective, substrate competitive inhibitor of N-lysine methyltransferase SETD8 with IC50 of 7.9 μM, high selectivity over 15 other methyltransferases.</i>	Epigenetics	Histone Methyltransferase
A-366	<i>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.</i>	Epigenetics	Histone Methyltransferase
GSK-LSD1 2HCI	<i>GSK-LSD1 2HCI 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).</i>	Epigenetics	Histone Demethylase
GSK J1	<i>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,</i>	Epigenetics	Histone Demethylase

	>10-fold selectivity over other tested demethylases.		
Anacardic Acid	Anacardic Acid is a potent inhibitor of p300 and p300/CBP-associated factor histone acetyltransferases, which also has antibacterial activity, antimicrobial activity, prostaglandin synthase inhibition, and tyrosinase and lipoxygenase inhibition.	Epigenetics	Histone Acetyltransferase
BRD4770	BRD4770 is a histone methyltransferase G9a inhibitor with IC50 of 6.3 μM, and induces cell senescence.	Epigenetics	Histone Methyltransferase
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/STAT	JAK
UNC0631	UNC0631 is a potent histone methyltransferase G9a inhibitor with IC50 of 4 nM.	Epigenetics	Histone Methyltransferase
EI1	EI1 is a potent and selective EZH2 inhibitor with IC50 of 15 nM and 13 nM for EZH2 (WT) and EZH2 (Y641F), respectively.	Epigenetics	Histone Methyltransferase
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.	Epigenetics	Histone Methyltransferase
MI-2 (Menin-MLL Inhibitor)	MI-2 (Menin-MLL Inhibitor) is a potent menin-MLL	Epigenetics	Histone Methyltransferase

	<i>interaction inhibitor with IC50 of 446 nM.</i>		
MI-3 (Menin-MLL Inhibitor)	<i>MI-3 (Menin-MLL Inhibitor) is a potent menin-MLL interaction inhibitor with IC50 of 648 nM.</i>	<i>Epigenetics</i>	Histone Methyltransferase
GSK1324726A (I-BET726)	<i>GSK1324726A (I-BET726) is a highly selective inhibitor of BET family proteins with IC50 of 41 nM, 31 nM, and 22 nM for BRD2, BRD3, and BRD4, respectively.</i>	<i>Epigenetics</i>	Epigenetic Reader Domain
Niraparib (MK-4827) tosylate	<i>MK-4827(Niraparib) tosylate is a selective inhibitor of PARP1/PARP2 with IC50 of 3.8 nM/2.1 nM.</i>	DNA Damage	PARP
Remodelin	<i>Remodelin is a potent acetyl-transferase NAT10 inhibitor.</i>	<i>Epigenetics</i>	Histone Acetyltransferase
CPI-360	<i>CPI-360 is a potent, selective, and SAM-competitive EZH1 inhibitor with IC50 of 102.3 nM, >100-fold selectivity over other methyltransferases.</i>	<i>Epigenetics</i>	Histone Methyltransferase
SP2509	<i>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.</i>	<i>Epigenetics</i>	Histone Demethylase
OF-1	<i>OF-1 is a potent inhibitor of BRPF1B and BRPF2 bromodomain with K_d of 100 nM and 500 nM, respectively.</i>	<i>Epigenetics</i>	Epigenetic Reader Domain
EPZ015666(GSK3235025)	<i>EPZ015666 is a potent, selective and</i>	<i>Epigenetics</i>	Histone Methyltransferase

	<p><i>orally bioavailable</i> PRMT5 <i>inhibitor with</i> K_i <i>> of 5 nM, >20,000-fold</i> <i>selectivity over other</i> <i>PMTs.</i></p>		
AZ6102	<p>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.</p>	DNA Damage	PPAR
ORY-1001 (RG-6016) 2HCl	<p><i>ORY-1001 (RG-6016)</i> <i>is an orally active and</i> <i>selective lysine-</i> <i>specific demethylase</i> LSD1/KDM1A <i>inhibitor with</i> IC50 <i>of <20</i> <i>nM, with high</i> <i>selectivity against</i> <i>related FAD</i> <i>dependent</i> <i>aminooxidases. Phase</i> <i>1.</i></p>	Epigenetics	Histone Demethylase
GSK2879552 2HCl	<p>GSK2879552 2HCl is a potent, selective, orally bioavailable, irreversible LSD1 inhibitor with Kiapp of 1.7 μM. Phase 1.</p>	Epigenetics	Histone Demethylase
GSK503	<p><i>GSK503 is a potent</i> <i>and specific</i> EZH2 <i>methyltransferase</i> <i>inhibitor.</i></p>	Epigenetics	Histone Methyltransferase
EPZ011989	<p>EPZ011989 is a potent, selective, orally bioavailable EZH2 inhibitor with Ki of <3 nM.</p>	Epigenetics	Histone Methyltransferase
SGC707	<p>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.</p>	Epigenetics	Histone Methyltransferase

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.	Epigenetics	Epigenetic Reader Domain
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.	Epigenetics	HDAC
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/STAT	JAK
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.	JAK/STAT	Pim
BIX 01294	BIX01294 is an inhibitor of G9a histone methyltransferase with IC50 of 2.7 μM, reduces H3K9me2 of bulk histones, also weakly inhibits GLP (primarily H3K9me3), no significant activity observed at other histone methyltransferases.	Epigenetics	Histone Methyltransferase
UPF 1069	UPF 1069 is a selective PARP2 inhibitor with IC50 of 0.3 μM. It is ~27-fold selective against PARP1.	DNA Damage	PARP
Scriptaid	Scriptaid is an inhibitor of HDAC. It shows a greater effect on acetylated H4 than H3.	DNA Damage	HDAC

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).	Epigenetics	HDAC
Lomeguatrib	Lomeguatrib is a potent inhibitor of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase with IC50 of 5 nM.	Epigenetics	DNA Methyltransferase
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.	JAK/STAT	FLT3,JAK
Mirin	Mirin is a potent Mre11–Rad50–Nbs1 (MRN) complex inhibitor and inhibits Mre11-associated exonuclease activity.	DNA Damage	ATM/ATR
GSK591	GSK591 (EPZ015866, GSK3203591) is a potent selective inhibitor of the arginine methyltransferase PRMT5 with IC50 of 11 nM.	Epigenetics	Histone Methyltransferase
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.	Epigenetics	Histone Methyltransferase
Mitomycin C	Mitomycin C is an antineoplastic antibiotic by inhibiting DNA synthesis, used to treat different cancers.	DNA Damage	DNA/RNA Synthesis
BI-7273	BI-7273 is a potent, selective, and cell-permeable BRD9 BD Inhibitor.	Epigenetics	Epigenetic Reader Domain
PF-CBP1 HCl	PF-CBP1 is a highly selective inhibitor of the bromodomain of	Epigenetics	Epigenetic Reader Domain

	CREB-binding protein(CREBBP).It inhibits CREBBP and p300 bromodomains with IC50 of 125 and 363 nM respectively.		
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/STAT	JAK
HLCL-61 HCL	HLCL-61 hydrochloride is a potent and selective PRMT5 inhibitor for the treatment of acute myeloid leukemia.	Epigenetics	Histone Methyltransferase
ITSA-1 (ITSA1)	ITSA-1 (ITSA1) is an HDAC activator via TSA suppression but shows no activity towards other HDAC inhibitors.	Epigenetics	HDAC
Gemcitabine HCl	Gemcitabine HCl is a DNA synthesis inhibitor with IC50 of 50 nM, 40 nM, 18 nM and 12 nM in PANC1, MIAPaCa2, BxPC3 and Capan2 cells, respectively.	DNA Damage	Autophagy,DNA/RNA Synthesis
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 Damage	DNA/RNA Synthesis
Daptomycin	Daptomycin is a novel antibiotic with rapid in vitro bactericidal activity against gram-positive organisms.	DNA Damage	DNA/RNA Synthesis
Mizoribine	Mizoribine is an imidazole nucleoside, selectively inhibits inosine monophosphate synthetase and guanosine	DNA Damage	DNA/RNA Synthesis

	monophosphate synthetase.		
Cytarabine	Cytarabine is an antimetabolic agent and DNA synthesis inhibitor with IC50 of 16 nM in wild-type CCRF-CEM cells.	DNA Damage	DNA/RNA Synthesis
Nedaplatin	Nedaplatin is a derivative of cisplatin and DNA damage agent for tumor colony forming units with IC50 of 94 μM.	DNA Damage	DNA/RNA Synthesis
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 Damage	DNA/RNA Synthesis
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 Damage	DNA/RNA Synthesis
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.	JAK/STAT	STAT