



Université de Montréal

**Étude préclinique de nouveaux médicaments inhibiteurs  
de PARP et Bcl-2 dans le neuroblastome**

par

Anissa Addioui

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

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

Février 2013

© Anissa Addioui, 2013

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Étude préclinique de nouveaux médicaments inhibiteurs de PARP et Bcl-2 dans le  
neuroblastome

Présenté par :  
Anissa Addioui

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Gilles Hickson, président-rapporteur  
Dr. Hervé Sartelet, directeur de recherche  
Dr. Yvan Samson, membre du jury

## Résumé

Le neuroblastome (NB) est la tumeur solide extracranienne la plus fréquente chez le jeune enfant. En dépit de plusieurs avancements thérapeutiques, seulement 60% survivront à long terme. Cette résistance aux traitements est possiblement due, en partie, à la présence des cellules souches cancéreuses (CSC). PARP-1 joue un rôle important dans la chimiorésistance de certaines tumeurs et son inhibition a montré une potentialisation des agents anticancéreux conventionnels. De plus, Bcl-2 est surexprimé dans le NB et son expression accrue contribuerait à la résistance à la chimiothérapie. Le but de notre travail était de déterminer les effets *in vitro* d'un PARP inhibiteur, AG-014699 (AG), et d'un inhibiteur de Bcl-2, Obatoclax (Obx), *in vitro* et *in vivo*, en monothérapie ou en combinaison avec de la Doxorubicine (Doxo) ou du Cisplatine (Cis), deux agents anticancéreux classiquement utilisés dans le traitement du NB.

Afin de déterminer l'expression de PARP-1 dans les tumeurs de NB, nous avons analysé une cohorte de 132 tumeurs. Nous avons utilisé le test MTT afin d'évaluer la sensibilité de 6 lignées cellulaires de NB et des CSC à un traitement avec AG seul ou en combinaison avec de la Doxo ou du Cis. Nous avons déterminé l'étendue de la mort cellulaire par Annexin-V et caractérisé les dommages à l'ADN à l'aide d'un marquage  $\gamma$ H2aX. De plus, les modulations des voies de signalisation intracellulaire ont été analysées par Western Blot. La sensibilité des cellules à l'Obx a été analysée par MTT sur 6 lignées cellulaires de NB et sa combinaison avec le Cis a également été déterminée dans 2 lignées cellulaires. Le marquage Annexin-V et des combinaisons avec ZVAD-FMK ont aussi été utilisés pour caractériser les effets d'Obx sur l'apoptose. Des expériences *in vivo* ont également été faites.

Nos résultats démontrent que l'expression de PARP-1 est associée aux tumeurs moins agressives. AG n'a peu ou pas effet sur la croissance tumorale et ne potentialise pas significativement les effets de la Doxo ou de Cis. AG combiné à la Doxo semble sensibiliser les CSC dans une lignée cellulaire. L'Annexin-V et le marquage  $\gamma$ H2aX ne révèlent pas d'effets synergiques de cette combinaison et les dommages à l'ADN et la mort cellulaire observés sont attribués à la Doxo. Cependant, on observe une augmentation d'apoptose et de bris d'ADN dans une lignée cellulaire (SK-N-FI) lorsqu'AG est utilisé en monothérapie. On observe une surexpression de pAKT et pERK suite à la combinaison Doxo et AG. Les cellules de NB sont sensibles à l'Obx à des concentrations à l'échelle nanomolaire. De plus, Obx active la mort cellulaire par apoptose. Aussi, Obx a un effet synergique avec le Cis *in vitro*. *In vivo*, l'Obx diminue significativement la taille tumorale.

Nous concluons que l'Obx présente une avenue thérapeutique prometteuse dans le traitement du NB alors que l'utilisation d'AG ne semble pas être aussi encourageante.

**Mots-clés** : Neuroblastome, cellules souches cancéreuses, AG-014699, Obatoclax.

## Abstract

Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid tumour of childhood. In spite of many therapeutic improvements, only 60% survive long term. Presence of cancer stem cell (CSCs) is thought to mediate such resistance. PARP-1 plays an important role in the chemoresistance of certain tumours and its inhibition is shown to potentiate cells to routinely used anticancer agents. Moreover, Bcl-2 is over-expressed in NB and that its increased expression would contribute to chemotherapy resistance. Our goal was to determine the efficacy *in vitro* of a PARP inhibitor, AG-014699 (AG), and a Bcl-2 inhibitor, Obatoclax (Obx), *in vitro* and *in vivo*, in monotherapy or in combination to Doxorubicine (Doxo) and Cisplatin (Cis), classical chemotherapeutic agents used in NB treatment.

In order to determine PARP-1 expression in NB tumours, 132 tumours were analyzed. We used an MTT test to evaluate 6 NB cell line and CSC sensitivity to AG alone or in combination to Doxo and Cis. We investigated the extent of cell death by Annexin-V and determined the degree of DNA damage by  $\gamma$ H2aX staining. Also, signalling pathway modulations were analyzed by Western Blots. Obx sensitivity was determined by MTT test on 6 NB cell lines and its combination to Cis was also examined in 2 NB cell lines. Annexin-V and combinations to ZVAD-FMK also evaluated its effect on apoptosis. *In vivo* experiments were also done.

Our results show that PARP-1 is associated to less aggressive tumors. AG has little to no effect on tumour growth when used alone and does not potentiate the effects of Doxo and Cis although more experiments will be needed. AG combined to Doxo seems to sensitize CSC in one cell line. Annexin-V and  $\gamma$ H2aX staining reveal no effects of AG combination and Doxo mostly confers all cell damage and death. However, we do observe an increase in DNA damage and apoptosis in one cell line (SK-N-FI) when AG is used in monotherapy. pAKT and pERK are upregulated by Doxo and AG combination. NB cells are sensitized to Obx at nanomolar concentrations. Also, Obx activates apoptotic cell death. Moreover, Obx synergizes with Cis *in vitro*. *In vivo*, Obx significantly decreases tumor size.

We conclude that Obx seems like a promising therapeutic approach in NB treatment whilst AG does not look so encouraging.

**Keywords:** Neuroblastoma, cancer stem cells, AG-014699, Obatoclax

# Table des matières

<b>Liste des sigles et des abréviations .....</b>	<b>viii</b>
<b>Chapitre 1 : Le neuroblastome dans son ensemble .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Le développement du neuroblastome .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Épidémiologie.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Présentation clinique .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Diagnostic.....</b>	<b>6</b>
<b>1.5 Facteurs pronostiques utilisés .....</b>	<b>7</b>
1.5.1 Facteurs pronostiques cliniques .....	8
1.5.2 Facteurs pronostiques histologiques.....	11
1.5.3. Facteurs pronostiques biologiques.....	12
1.5.3.1 Facteurs génétiques .....	13
<b>1.6 Traitements .....</b>	<b>14</b>
1.6.1 Traitement actuel du NB à haut risque .....	14
1.6.2 Les nouveaux agents thérapeutiques.....	15
<b>Chapitre 2 : Les inhibiteurs de PARP et de Bcl-2 .....</b>	<b>17</b>
<b>Les inhibiteurs de PARP .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 PARP dans la cellule.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Fonction de PARP-1 dans la réparation d'ADN .....</b>	<b>19</b>
2.2.1 Rôle de PARP-1 dans la réparation BER.....	19
2.2.2 Rôle de PARP-1 dans la réparation HR .....	20
<b>2.3 PARP-1 dans la cancérogénèse .....</b>	<b>21</b>
<b>2.4 Fonctions du PARP inhibiteur comme agent anticancéreux.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5 L'utilisation de PARPi en thérapie combinée.....</b>	<b>24</b>
2.5.1 AG.....	25
<b>Les inhibiteurs de Bcl-2.....</b>	<b>26</b>
<b>2.6 Bcl-2 dans la cellule .....</b>	<b>26</b>
<b>2.7 L'apoptose .....</b>	<b>26</b>

2.7.1 L'apoptose et le développement tumoral.....	28
<b>2.8 Bcl-2 dans le NB .....</b>	<b>30</b>
<b>2.9 Inhibiteur de Bcl-2 comme thérapie anticancéreuse .....</b>	<b>30</b>
<b>2.10 Obx (GX 15-070) .....</b>	<b>31</b>
<b>Chapitre 3 : Les cellules souches cancéreuses dans le NB .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Le modèle stochastique et hiérarchique des CSC .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2 Les marqueurs des CSC .....</b>	<b>34</b>
3.2.1 CD133.....	34
<b>3.3. La résistance des CSC aux traitements de chimiothérapies conventionnels.....</b>	<b>36</b>
<b>Projet de recherche .....</b>	<b>38</b>
Chapitre 4.....	38
4.1 Objectifs de recherche.....	39
4.2 Stratégie expérimentale .....	39
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>40</b>
Chapitre 5 .....	40
5.1 Lignées cellulaires de NB.....	40
5.2 Tumeurs .....	40
5.3 Cytométrie de flux.....	41
5.4 Études in vivo.....	41
5.5 Immunohistochimie .....	42
5.6 Viabilité cellulaire .....	43
5.7 Mesure de l'activité enzymatique de PARP-1 .....	43
5.8 Immunofluorescence .....	44
5.9 Extraction protéique et Western Blot.....	44
5.10 Analyse de l'apoptose par Annexin-V .....	45
5.11 Analyses statistiques.....	46
<b>Résultats.....</b>	<b>47</b>
Chapitre 6.....	47

<b>6.1 Étude d'un inhibiteur de PARP-1, AG, dans le NB.....</b>	<b>47</b>
6.1.1 PARP-1 est associée aux tumeurs de bon pronostic.....	47
6.1.2 Effet d'AG en monothérapie sur les cellules de NB.....	50
6.1.3 AG inhibe l'activité enzymatique de PARP-1.....	52
6.1.4 Traitement d'AG en combinaison avec la Doxo.....	53
6.1.5 Effet des traitements d'AG seul ou en combinaison avec la Doxo sur les DSB d'ADN.....	55
6.1.6 Analyse de l'apoptose après traitement par AG.....	57
6.1.7 Traitements d'AG en combinaison avec le Cis.....	60
6.1.8 Effet des traitements combinés d'AG et de Doxo sur les CSC.....	61
6.1.9 Modulation de la voie PI3K/AKT et MAPK lorsque AG est combiné à la Doxo.....	64
<b>6.2 Étude d'un inhibiteur de Bcl-2, Obx, dans le NB.....</b>	<b>66</b>
6.2.1 Action d'Obx en monothérapie sur les cellules de NB.....	66
6.2.2 Étude de l'effet synergique Obx avec Cis.....	68
6.2.3 Étude de l'apoptose après traitement par Obx.....	69
6.2.4 Obx confirme son effet anti-tumoral <i>in vivo</i> .....	71
<b>Discussion.....</b>	<b>74</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>90</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>91</b>



## Liste des tableaux

<b>Tableau I : Stratification des patients en groupe de risque selon la présence ou l'absence de certains facteurs pronostiques.....</b>	<b>6</b>
<b>Tableau II: Classification INSS des stades du NB .....</b>	<b>10</b>
<b>Tableau III : Stratification des tumeurs de NB selon l'INPC .....</b>	<b>12</b>
<b>Tableau IV: Corrélation entre l'amplification de <i>MYCN</i> et le stade du NB.....</b>	<b>13</b>
<b>Tableau V : Inhibiteurs de PARP en développement .....</b>	<b>23</b>
<b>Tableau VI : Études ayant utilisé le marqueur CD133 pour isoler les CSC. ....</b>	<b>35</b>
<b>Tableau VII : Anomalies génétiques des différentes lignées cellulaires de NB .....</b>	<b>40</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1 : Le développement de la crête neurale.</b> .....	2
<b>Figure 2 : Système nerveux sympathique.</b> .....	3
<b>Figure 3 : Représentation schématique de PARP-1.</b> .....	18
<b>Figure 4 : Illustration du mécanisme de réparation de bris d'ADN</b> .....	20
<b>Figure 5 : Inhibition de PARP-1 cause la réparation anormale de SSB.</b> .....	24
<b>Figure 6 : Interaction simplifié des membres de la famille Bcl-2.</b> .....	28
<b>Figure 7 : L'expression nucléaire de PARP-1 est associée aux tumeurs de bon pronostics.</b> .....	49
<b>Figure 8 : Traitements avec AG en monothérapie.</b> .....	51
<b>Figure 9 : Activité enzymatique de PARP-1.</b> .....	53
<b>Figure 10 : Traitements d'AG en combinaison avec la Doxo.</b> .....	54
<b>Figure 11 : Effet des traitements d'AG seul ou en combinaison avec la Doxo sur les bris double brins d'ADN.</b> .....	57
<b>Figure 12 : L'AG n'induit pas la mort cellulaire par apoptose.</b> .....	59
<b>Figure 13 : Traitements d'AG en combinaison avec le Cis.</b> .....	61
<b>Figure 14 : Effet des traitements combinés d'AG et de Doxo sur les CSC.</b> .....	63
<b>Figure 15 : Effet des traitements de PARPi seul ou en combinaison avec la Doxo sur la modulation des voie de signalisation.</b> .....	65
<b>Figure 16 : Effet de l'Obx en monothérapie.</b> .....	67
<b>Figure 17 : Obx en thérapie combinée avec le Cis.</b> .....	69
<b>Figure 18 : Effet de l'Obx sur l'apoptose.</b> .....	70
<b>Figure 19 : Obx seul diminue significativement la taille tumorale <i>in vivo</i>.</b> .....	73

## Liste des sigles et des abréviations

**AG** : AG-014699

**AMD** : Central automodification domain/ Domaine d'automodification centrale

**AML** : Acute myeloid leukemia/ Leucémie myéloïde aiguë

**ATCC** : American type tissue culture collection

**ATM** : Ataxia-telangiectasia mutated

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

**BER** : Base Excision Repair/ Réparation par excision de base

**BH** : Bcl-2 homology / homologue à Bcl-2

**CD** : C-terminal catalytic domaine / Domaine catalytique à la position C-terminale

**Ch14.18**: Anticorps monoclonal chimérique 14.18

**Cis** : Cisplatine

**CN** : Crête neurale

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

**CSC** : Cancer stem cells/ Cellules souches cancéreuses

**DBD** : N-terminal DNA binding domain/ le domaine liant l'ADN à la position N-terminal

**DOPA** : Dopamine

**Doxo**: Doxorubicine

**DSB** : Bris double brins

**GD2** : Disialoganglioside

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

**GN** : Ganglioneurome

**GNB** : Ganglioneuroblastome

**HR** : Homologous recombination/ Recombinaison homologue

**HVA** : Acide homovanillique

**Il-2** : Interleukine-2

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

**INRGSS** : International Neuroblastoma Risk Group Staging System / Système international de stadification des risques du neuroblastome

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

**IR** : Irradiation ionisante

**L1** : Maladie localisée sans facteurs de risque définis par image

**L2** : Maladie localisée avec facteurs de risque définis par image

**LOH** : Perte d'hétérozygotie

**M** : Tumeur métastatique

**MKI** : L'index mitose-caryorrhexie

**MOMP** : Mitochondrial outer membrane permeability/ Perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie

**mRNA** : ARN messenger

**MS** : Tumeur métastatique avec métastases définies à la peau, au foie et/ou à la moelle osseuse chez des enfants de moins de 18 mois

**NAD** : Nicotinamide adénine dinucléotide

**NB** : Neuroblastome

**NSCLC** : Non Small Cell Lung Carcinoma/ cancer du poumon non à petites cellules

**NGF** : Neuronal growth factor / Facteur de croissance neuronal

**NLS** : Nuclear localization signal/ signal de localisation nucléaire

**NOD/SCID**: Non-obese diabetic, severe combined immunodeficient / Souris non obèse et non diabétique, immunodéficente combiné sévère

**NORA** : Noradrénaline

**OBX** : Obatoclax

**ORF** : Open reading frame/ Cadre de lecture

**PAR** : Poly(ADP)-ribose/ Molécule d'ADP ribose

**PARPi** : Inhibiteur de PARP

**QNS** : Quebec Neuroblastoma Study

**RNAi** : ARN interférant

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

**SNS** : Système nerveux sympathique

**SSB** : Bris simple brin

**TEM** : Transition épithélio-mésenchymateuse

**TOP I** : Topoisomérase I

**TOP II** : Topoisomérase II

**Trk** : Tyrosine receptor kinase / Récepteur tyrosine kinase

**VMA** : Acide vanylmandélique

*Bismillah,*

## **Remerciements**

*Je voudrais remercier mon directeur, le Dr Hervé Sartelet pour son aide et ses conseils.*

*Je tiens à remercier Dre Carine Nyalendo pour sa patience infinie et qui, malgré son départ hâtif, a facilité énormément mon cheminement.*

*Je veux aussi remercier Sonia Cournoyer et Assila Belounis. Deux filles merveilleuses qui ont rendu mon parcours mémorable. Je vous remercie pour votre temps, votre aide, et tous les moments agréables passés ensemble. Vous avez embelli ce chapitre de ma vie qui n'a pas toujours été facile.*

*Je veux remercier le Département de pathologie et biologie cellulaire, la Fédération des études supérieures et postdoctorales et le CHU Sainte-Justine pour leur support financier.*

*Enfin, je tiens à remercier mes proches pour leur support inconditionnel. Un énorme merci à mes parents, pour leur présence, leur écoute et leurs encouragements dans les meilleurs et les pires moments. Deux personnes qui, par leurs sacrifices, m'ont permis d'être qui je suis aujourd'hui. Merci d'avoir toujours eu confiance en moi. Un remerciement spécial à mon frère, qui m'a toujours supporté dans mes études. Finalement, je tiens à remercier mon mari, qui a su et qui sait toujours comment me faire sourire et m'encourager dans les moments difficiles.*

# Introduction

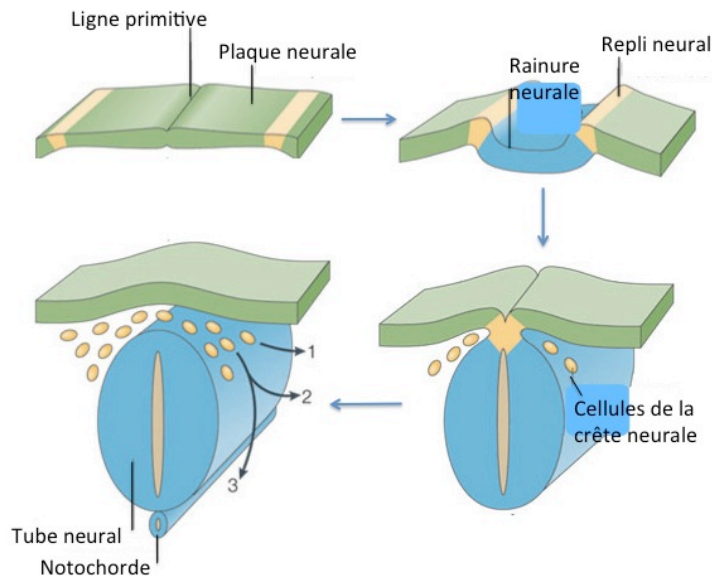
## Chapitre 1 : Le neuroblastome dans son ensemble

Le neuroblastome (NB) est une tumeur provenant du système nerveux sympathique (SNS) et représente plus de 8% de tous les cancers pédiatriques <sup>1</sup>. On la retrouve dans près de 10,2 cas par million d'enfants âgés de 15 ans et moins et cette tumeur est la plus souvent diagnostiquée durant la première année de vie <sup>1</sup>. Elle est principalement caractérisée par une hétérogénéité clinique et biologique <sup>2</sup>. En effet, certains patients auront une régression complète de leur tumeur avec peu ou pas de chimiothérapie, alors que chez d'autres, le NB se développe et forme plusieurs métastases malgré les traitements anticancéreux agressifs <sup>1</sup>. En effet, seulement 40% des patients atteints de NB survivent à la maladie <sup>3</sup>. Il est donc primordial de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'augmenter la survie des patients atteints de NB à haut risque.

### 1.1 Le développement du neuroblastome

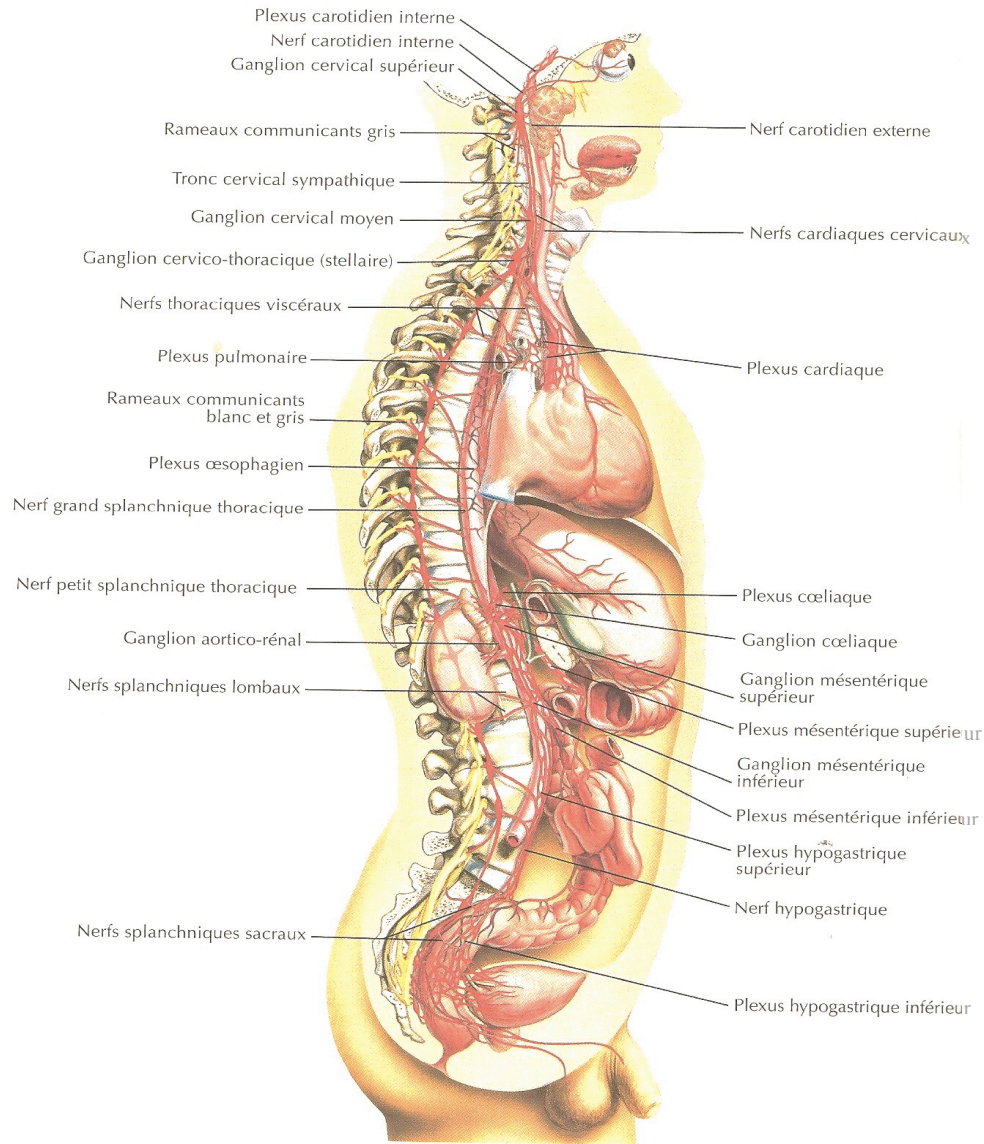
Le cancer du NB prend naissance dans les cellules nerveuses immatures qui vont former le SNS. Ces dernières dérivent des cellules de la crête neurale (CN) <sup>1</sup>. Générée à partir de la partie dorsale du tube neural, la CN représente une population cellulaire transitoire et multipotente spécifique aux vertébrés <sup>4</sup>. Elle se forme suite à l'étape de gastrulation du développement embryonnaire et se localise à la jonction entre la plaque neurale et l'ectoderme (figure 1). Les cellules de CN subissent alors une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) qui permettra le détachement et la migration d'une population cellulaire définie <sup>5</sup>. Elles migrent vers diverses régions de l'embryon et donnent naissance à une grande diversité de types cellulaires soit les neurones périphériques, les cellules gliales du SNS parasympathique et sensoriel, les cellules du tissu conjonctif, les mélanocytes, les cellules du muscle lisse et les cellules endocrines <sup>6,7</sup>.





**Figure 1 : Le développement de la crête neurale.** La crête neurale (jaune) se retrouve initialement sur les extrémités de la plaque neurale (vert). La plaque neurale se replie sur elle-même et suite à la fermeture du tube neural (bleu), les CCN situées sur le toit du tube subissent une TEM et migreront dans l'ensemble de l'embryon. CCN : Cellules de la crête neurale. *Illustration adaptée de* <sup>8</sup>.

Les cellules de la CN sont, au départ, des cellules souches multipotentes mais leurs capacités de différenciation se limitent au fur et à mesure qu'elles se développent. Ainsi, lorsqu'elles se distancent du tube neural, elles acquièrent une différenciation unique dépendamment de leur direction de migration <sup>9</sup>. Elles peuvent demeurer peu différenciées et immatures (ex : les neuroblastes), ou différenciées et matures (ex : les cellules ganglionnaires). Les tumeurs du NB se développeront lorsqu'il y a une mutation génétique ou épigénétique des gènes responsables de la programmation correcte de ces CN<sup>10</sup>. Le NB peut donc se développer à partir du SNS (Figure 2). Il se développera généralement au niveau des glandes surrénales, du cou, du thorax, de l'abdomen ou du pelvis <sup>2</sup>.



**Figure 2 : Système nerveux sympathique.** La majorité des NB sont localisés dans les glandes surrénales, mais elles peuvent survenir partout dans le SNS.

*Illustration adaptée de <sup>11</sup>.*

## 1.2 Épidémiologie

Chaque année au Canada, on retrouve environ 65 nouveaux cas de NB. Quarante-vingt dix pour cent des NB sont diagnostiqués chez les enfants de moins de cinq ans <sup>12</sup>. Le NB

est le troisième cancer le plus fréquent chez l'enfant, précédé des leucémies (myéloïdes aiguës et lymphoblastiques aiguës) et des cancers du système nerveux central tel les astrocytomes. Par contre, chez le nourrisson de moins de 1 an, le NB est la tumeur la plus fréquente et représente environ 30% des cancers <sup>13</sup>.

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

### **1.3 Présentation clinique**

Dû à sa grande hétérogénéité clinique, le NB a longtemps été considéré comme le cancer le plus énigmatique. La grande majorité des tumeurs primaires se développent dans l'abdomen dont 50% se trouvent dans la glande médullosurrénale <sup>2</sup>. On la retrouve aussi dans le cou, le thorax et le pelvis <sup>2</sup>. Les signes et symptômes cliniques sont hautement variables dépendamment de la localisation de la tumeur primaire, ainsi que de la présence, ou non, de métastases. Malgré cette grande hétérogénéité, on peut observer trois évolutions tumorales distinctes : une progression rapide conduisant au décès du patient même après traitements agressifs (comprenant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie à haute dose dont une greffe autologue de moelle osseuse), une tumeur agressive mais contrôlable par un traitement associant chirurgie et chimiothérapie, ou, très rarement, une maturation en une tumeur bénigne appelé ganglioneurome (GN) voire une régression spontanée <sup>14</sup>.

Afin de mieux prendre en charge le traitement, les patients atteints de NB sont divisés en groupes de risques qui tiendront compte de données cliniques, biologiques et pathologiques de la tumeur (Tableau I) <sup>20</sup>. On utilise en particulier le système de stadification international

du NB (INSS : *International Neuroblastoma Staging System*) qui identifie cinq groupes pronostiques définis soit les stades 1, 2A, 2B, 3, 4 et 4S que nous verrons plus loin dans la section des facteurs pronostiques cliniques (Tableau I)<sup>21</sup>. Grâce aux données cliniques, biologiques et pathologiques de la tumeur, on peut diviser les patients en trois groupes. Les patients que l'on classifie comme étant à faible risque requièrent seulement une chirurgie. Leur survie est de plus de 90% et certains patients démontreront une régression spontanée de la tumeur<sup>22,23</sup>. Pour les enfants à risque intermédiaire, on observe plus de 90% de survie suivant une chirurgie et la chimiothérapie<sup>24</sup>. Les patients à haut risque auront une survie à long terme de 30-40% malgré des traitements agressifs de chimiothérapie, de radiothérapie et de greffes de cellules souches<sup>21</sup>. De plus, ces cas de haut risque sont associés aux rechutes fréquentes et à la résistance aux agents chimiothérapeutiques<sup>1</sup>. Stratifier ces patients en groupes de risque est d'une extrême importance car les traitements dépendront de cette classification.

**Tableau I : Stratification des patients en groupe de risque selon la présence ou l'absence de certains facteurs pronostiques.**

Stage INSS	Âge	Statut MYCN	Histologie Shimada	Ploidie de l'ADN	Groupe de Risque
1	0-21 a	PI	PI	PI	Faible
2A/2B	< 365 j	PI	PI	PI	Faible
	≥ 365 j– 21 a	Non-Amp	PI	-	Faible
	≥ 365 j– 21 a	Amp	Fav	-	Faible
	≥ 365 j– 21 a	Amp	Non-Fav	-	Haut
3	< 365 j	Non-Amp	PI	PI	Intermédiaire
	< 365 j	Amp	PI	PI	Haut
	≥ 365 j– 21 a	Non-Amp	Fav	-	Intermédiaire
	≥ 365 j– 21 a	Non-Amp	Non-Fav	-	Haut
	≥ 365 j– 21 a	Amp	PI	-	Haut
4	< 365 j	Non-Amp	PI	PI	Intermédiaire
	< 365 j	Amp	PI	PI	Haut
	≥ 365 j– 21 a	PI	PI	-	Haut
4s	< 365 j	Non-Amp	Fav	> 1	Faible
	< 365 j	Non-Amp	PI	= 1	Intermédiaire
	< 365 j	Non-Amp	Non-Fav	PI	Intermédiaire
	< 365 j	Amp	PI	PI	Haut

Les patients âgés de moins de 1 an ou ceux ayant un MYCN non amplifié constituent le groupe de risque faible. **j** : jours, **a** : années, **Amp** : Amplifié, **Non-Amp** : Non-Amplifié, **Fav** : Favorable, **Non-Fav** : non-favorable, **PI** : peu importe

*Tableau adapté de <sup>25</sup>.*

#### 1.4 Diagnostic

Le diagnostic du NB se fait souvent à la suite des analyses histologiques de tissus tumoraux (voir section facteurs pronostiques histologiques). Il se fait aussi à l'aide des concentrations d'acide homovanillique (HVA) et vanylmandélique (VMA) retrouvés dans l'urine combiné à une aspiration de moelle osseuse pour détecter la présence de cellules tumorales <sup>26</sup>.

En effet, le NB se caractérise par la synthèse anormale de la tyrosine, un acide aminé aromatique, en catécholamines. Une synthèse fractionnée de ces catécholamines permet

d'analyser différents métabolites qui prédisent le stade de développement du NB. Par exemple, les NB de haut grade sont caractérisés par une diminution accrue de la dopamine- $\beta$  hydroxylase, une enzyme qui convertit la dopamine (DOPA) en noradrénaline (NORA). On retrouve ainsi une excrétion urinaire anormalement élevée de DOPA et HVA et une élimination diminuée de VMA, un métabolite de la NORA. Lorsque le rapport VMA/HVA est inférieur à la normale, cela suggère la présence d'un NB agressif <sup>26</sup>.

Puisque ces métabolites peuvent être facilement détecté dans l'urine, il a été proposé entre les années 1989 à 1994, d'établir des programmes de dépistage de masse pour la détection du NB à la naissance et chez les enfants âgés entre 3 semaines et 6 mois <sup>27</sup>. Ces études ont été réalisées par le *Quebec Neuroblastoma Study* (QNS) et impliquaient une cohorte au Québec faisant l'objet de dépistage suivie parallèlement à deux cohortes contrôles situées en Ontario et aux États-Unis, ne faisant l'objet d'aucun dépistage. Cette étude a pris naissance à la suite d'un programme national de dépistage de NB qui avait été instauré en 1985 au Japon sans preuve scientifique concluante. Malheureusement le QNS a démontré que ces dépistages de masse n'eurent aucun effet sur l'amélioration du pronostic. En effet, ces programmes doubleraient l'incidence du NB chez les enfants âgés de moins d'un an, sans diminution significative de la mortalité et des cas de NB plus avancés chez les enfants âgés d'un an et plus <sup>27</sup>. En 2008, une étude rétrospective a été effectuée au Japon impliquant 13 millions d'enfants, nés entre 1980 et 1998, atteints d'un NB <sup>26</sup>. Les auteurs concluent que depuis 20 ans le dépistage systématique n'a pas modifié la survie de NB <sup>26</sup>. Ainsi au Japon, le dépistage de masse a été abandonné <sup>28</sup>.

### **1.5 Facteurs pronostiques utilisés**

Le NB est une tumeur qui démontre une grande hétérogénéité clinique lui conférant ainsi un pronostic très variable. Les soins pouvant varier d'une simple chirurgie à des traitements anticancéreux agressifs, plusieurs facteurs entrent en ligne de compte pour déterminer la thérapeutique à suivre. En effet, son pronostic est établi selon des facteurs

cliniques tels le classement INSS, l'âge des patients au diagnostic (voir prochaine section), les facteurs biologiques ainsi que des facteurs histologiques qui feront tous deux l'objet des paragraphes suivants.. Les pronostics les moins bons ont été observés chez les enfants diagnostiqués plus tard (>15 mois), ceux qui présentaient déjà un stade avancé de la maladie, ainsi que ceux ayant des tumeurs positives pour certains marqueurs biologiques tels que *MYCN* ou encore la perte chromosomique des régions 1p et 11q<sup>14,29</sup>.

### **1.5.1 Facteurs pronostiques cliniques**

#### ***L'âge***

La survie des enfants atteints varie beaucoup en fonction de leur âge au diagnostic, avec un meilleur pronostic chez les plus jeunes<sup>2</sup>. On utilise classiquement un âge seuil de 12 mois afin de prédire le pronostic<sup>30</sup>. Au départ, les études ont démontré que les patients de moins de 1 an avaient un meilleur taux de survie que ceux de plus de 12 mois. Par contre, certains patients entre 12 et 18 mois présentent aussi un haut taux de survie, alors que ceux âgés de 18 à 24 mois ont un pronostic équivalent à ceux de 24 mois et plus, suggérant ainsi l'établissement d'un nouvel âge seuil de 18 mois<sup>31</sup>. Cette réévaluation de l'âge limite est très controversée et en général l'âge du diagnostic favorable demeure 12 mois. La moitié des NB chez les enfants de plus de 1 an seront métastatiques. Ces tumeurs de stades 3 et 4 se caractérisent par une très mauvaise survie comparée à celles des stades localisés 1 et 2 (Tableau II), dont la survie à long terme dépasse 80%, tous âges confondus.

#### ***La classification clinique en fonction des métastases***

La classification INSS (Tableau II) est un système de classement servant à diviser les patients en différents stades en fonction de l'extension loco-régionale de la tumeur primaire, la présence ou non de métastases ainsi que leurs localisations. Initialement publié en 1988, ce système a, par la suite, été révisé en 1993 et est maintenant très bien reconnu<sup>30</sup>. L'INSS reconnaît 5 stades de la maladie identifiés de 1 à 4 ainsi que la catégorie 4s où le s

signifie *special* (Tableau II). La présence de métastases est un facteur déterminant dans la classification du NB. Elle s'attribue automatiquement au stade 3 ou 4, sauf si les métastases se retrouvent exclusivement sous forme de lésions cutanées, hépatiques ou encore dans la moelle osseuse chez un enfant de moins de 1 an, dans lesquels cas, le NB sera alors classé dans le groupe 4s<sup>26</sup>. Une tumeur de bas grade sera attribuée au stade 1 ou 2, alors qu'une tumeur de haut grade sera classée dans le groupe 3 ou 4. Le stade 4s n'est pas considéré comme d'un haut risque, car bien que la tumeur soit métastatique elle est d'un bon pronostic.

Depuis peu, on retrouve un second système de classification soit l'INRGSS (*International Neuroblastoma Risk Group Staging System*) qui regroupe les patients selon les caractéristiques radiologiques de la tumeur primaire au moment du diagnostic. Ainsi, les classements dépendront des résultats d'imagerie médicale et de la morphologie de la moelle osseuse<sup>2</sup>. INRSS reconnaît 4 stades de NB : L1 (maladie localisée sans métastases), L2 (maladie avec métastase localisée), M et MS catégorisent respectivement les tumeurs métastatiques et celles qui se développent comme le stade 4S du INSS<sup>2</sup>. Dans l'attente d'une stratification statistique robuste, le système INSS reste toujours le plus utilisé.



**Tableau II: Classification INSS des stades du NB.**

Stade INSS	Description	Risque de récurrence
<b>1</b>	Tumeur localisée, restreinte au site d'origine, exérèse macroscopiquement complète, avec ou sans résidu microscopique; les ganglions lymphatiques ipsilatéraux sont négatifs pour la tumeur au microscope.	<b>Bas</b>
<b>2a</b>	Tumeur localisée avec exérèse macroscopiquement incomplète; les ganglions lymphatiques ipsilatéraux sont négatifs pour la tumeur au microscope.	<b>Intermédiaire</b>
<b>2b</b>	Tumeur localisée avec ou sans exérèse macroscopiquement complète avec des ganglions lymphatiques ipsilatéraux envahis. Les ganglions lymphatiques controlatéraux doivent être microscopiquement négatifs.	
<b>3</b>	Tumeur unilatérale non résectuable dépassant la ligne médiane avec ou sans envahissement ganglionnaire régional ou tumeur localisée unilatérale avec ganglions lymphatiques controlatéraux envahis ou tumeur dépassant la ligne médiane avec extension bilatérale (non résectuable) ou ganglions lymphatiques envahis.	<b>Élevé</b>
<b>4</b>	Toutes tumeurs primaires avec extension métastatique tumorale à des ganglions lymphatiques à distance, l'os, la moelle osseuse, le foie, la peau et/ou d'autres organes (à l'exception de ceux définis au stade 4S).	
<b>4S</b>	Tumeur primaire localisée (comme défini par les stades 1, 2A ou 2B), avec extension métastatique limitée à la peau, au foie ou à la moelle osseuse (<10% de la tumeur) chez les enfants âgés de moins d'un an.	<b>Bas</b>

Tableau adapté de <sup>30</sup>.

Au moment du diagnostic, 50% des patients présentent une maladie localisée tandis que 35% montrent une atteinte ganglionnaire <sup>32</sup>. Les métastases peuvent se propager par voie hématogène ou lymphatique et ensemencent le plus souvent la moelle osseuse, les os et le foie <sup>32</sup>. L'ensemble des symptômes causés par les métastases hépatiques massives chez le nourrisson sont appelés syndrome de Pepper et peuvent être associées à des métastases cutanées ou de moelle osseuse. Les métastases cutanées, qui se retrouvent fréquemment chez les enfants de moins d'un an sont appelés syndrome du 'Blueberry Muffin' lorsque celles-ci forment des masses bleues ou mauves foncées sur la peau. Autres que dans les organes mentionnées plus haut, on retrouvera des métastases aussi très rarement dans les méninges, les poumons et le cerveau <sup>33</sup>.

### 1.5.2 Facteurs pronostiques histologiques

Il existe une troisième classification utilisée à l'échelle internationale. L'INPC (*International Neuroblastoma Pathology Classification*) distinguera les tumeurs à histologie favorable et non favorable selon leur degré de différenciation, l'index mitose-caryorrhexie (MKI) et l'âge des patients (Tableau III)<sup>34</sup>. Ce regroupement nous permettra alors de distinguer quatre morphologies tissulaires différentes soit le GN, le ganglioneuroblastome (GNB) mélangé et nodulaire et le NB<sup>34</sup>.

Le différent contenu cellulaire de ces quatre catégories de tumeurs est ce qui les distingue. En effet, la présence unique de stroma Schwannien et de cellules matures ganglionnaires est ce qui caractérise le GN, une tumeur bénigne. Par contre, les tumeurs composées de moins de 50% de stroma Schwannien et de cellules indifférenciées, sont appelées NB. Une tumeur composée de cellules matures, de neuroblastes en différenciation et qui contient au moins 50% de stroma Schwannien sera identifiée comme un GNB. Si les neuroblastes se regroupent pour former un ou plusieurs nodules visibles macroscopiquement, on l'appelle GNB nodulaire sinon il sera nommé GNB mélangé. Ainsi, la présence de tissu immature dans le GNB et le NB laisse présager un comportement tumoral agressif bien que le GNB soit de bien meilleur pronostic<sup>35</sup>.

La première étape étant complétée, l'INPC classifiera ensuite les tumeurs selon le MKI et l'âge de l'enfant lors du diagnostic. Comme il a été mentionné précédemment, un pronostic favorable dépend de l'âge du patient, avec une meilleure survie si ce dernier a moins de 12 mois. Le MKI est défini comme le pourcentage de cellules en division (mitose) et/ou qui démontrent du matériel nucléaire condensé et fragmenté (caryorrhexie). Ainsi, le groupe à histologie défavorable englobe les patients de plus de 60 mois se présentant avec n'importe quelle tumeur, les tumeurs indifférenciées ayant un MKI élevé tous âges confondus et les tumeurs indifférenciées ou peu différenciées avec un MKI intermédiaire ou élevé chez des enfants âgés de plus 18 mois<sup>3</sup>.

**Tableau III : Stratification des tumeurs de NB selon l'INPC**

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

Le classement INPC distingue quatre morphologies tissulaires et regroupe les tumeurs à histologie favorable et non favorable selon leur degré de différenciation, le MKI ainsi que l'âge des patients. *Tableau adapté de* <sup>36</sup>.

### 1.5.3. Facteurs pronostiques biologiques

Plusieurs études ont démontré que les neurotrophines, telles que les facteurs de croissance neuronaux (NGF : *Neuronal Growth Factor*) et les facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau (BDNF : *Brain-derived neurotrophic factor*) sont essentielles au développement du système nerveux central et périphérique. Elles interviennent en activant leurs récepteurs tyrosines kinases Trk-A et Trk-B (*Trk* : *Tyrosine receptor kinase*) et l'expression différentielle de ceux-ci sera prédictive de l'agressivité de la tumeur. Une surexpression de Trk-B est associée au NB de mauvais pronostic et à la chimiorésistance alors que l'expression de Trk-A est spécifiquement observée dans les tumeurs à faible risque <sup>37</sup>.

### 1.5.3.1 Facteurs génétiques

La particularité biologique du NB se retrouve dans la complexité des anomalies génétiques acquises par les cellules tumorales. Des études démontrent que la présence de certaines de ces anomalies génétiques serait un facteur pronostique de rechute plus puissant que tout autre facteur clinique <sup>38</sup>.

#### *MYCN*

Décrit et retrouvé dans les lignées cellulaires en 1983, le proto-oncogène *MYCN* est l'un des plus puissants facteurs pronostiques biologiques du NB et la recherche de l'amplification de *MYCN* est classiquement utilisée en clinique <sup>39,40</sup>. *MYCN* est retrouvé sur le chromosome 2 (2p24) et l'augmentation de nombre de copies est corrélée à la présence de métastases et à une progression rapide de la maladie quels que soient le stade et l'âge du patient <sup>41</sup>. Des études ont démontré une forte association entre l'amplification, le stade et le taux de survie (Tableau IV) <sup>42</sup>.

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

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

*Tableau adapté de* <sup>35</sup>.

D'autres facteurs génétiques incluent le gain du bras long du chromosome 17 (17q). Cette anomalie génétique a été identifiée en 1984 et est retrouvée dans 50 à 75% des NB. Elle est associée à un mauvais pronostic <sup>43,44,45</sup>. On retrouve également la délétion du chromosome 1p, qui est fortement corrélée à un mauvais pronostic. Cette perte est observée dans les

stades avancés du NB et les stades précoces non métastatiques ne montrent pas cette altération du chromosome 1<sup>46</sup>. La perte du chromosome 11q est également un facteur pronostic très important dans le NB. En effet, il a été montré que la délétion de 11q est associée à une évolution défavorable<sup>47</sup>. On retrouve aussi la délétion du chromosome 3p et la perte d'hétérozygotie (LOH) du chromosome 14q<sup>48</sup>.

## **1.6 Traitements**

Le traitement du NB varie beaucoup, allant d'une simple chirurgie à une combinaison agressive d'agents anticancéreux. Comme il a été mentionné précédemment, la prise en charge du patient dépendra du facteur de risque de la tumeur. Il existe trois groupes de risque : faible, intermédiaire et élevé. Le classement découlera de la détermination du stade INSS, de l'âge au diagnostic, de l'amplification *MYCN* et de l'histologie. Ainsi, le traitement du NB à faible risque se limite à l'observation ou l'excision chirurgicale. Les NB de risque intermédiaire démontrent l'évolution tumorale la plus variable dont la stratégie thérapeutique, souvent une chimiothérapie à dose minimale, dépendra de l'évolution clinique et anatomique de la tumeur. Le NB de haut grade requiert une thérapie très agressive incluant la chimiothérapie néo-adjuvante, la chirurgie, la chimiothérapie myélo-ablative avec thérapie cellulaire, la radiothérapie et autres. Malgré cela, les chances de survie ne sont que de 40%<sup>29</sup>.

### **1.6.1 Traitement actuel du NB à haut risque**

Le traitement suivant est celui proposé par le COG, protocole ANBL0032, actuellement fermé au recrutement (objectif atteint). Pour les patients de plus d'un an avec un NB métastatique à haut risque de rechute, le traitement actuel consiste premièrement à une induction par 6 cures de polychimiothérapie alternant aux 3 semaines et ce, durant 4 à 5 mois. Les cures 1 et 2 sont composées de Cyclophosphamide et Topotécan. Les cures 3 et 5 sont une association d'Étoposide et de Cisplatine (Cis). Les cures 4 et 6 sont composées d'une dose plus élevée de Cyclophosphamide, de la Doxorubicine (Doxo) et de la

Vincristine. De plus, une exérèse de la tumeur primitive sera faite après la 5<sup>ème</sup> cure de chimiothérapie. Ensuite, il y aura une consolidation par chimiothérapie à haute dose composée de Carboplatin, d'Étoposide et de Melphalan avec un support par autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. On effectuera aussi de la radiothérapie au site initial de la tumeur. En dernier, il y aura un traitement par immunothérapie que nous verrons dans le chapitre suivant. La totalité du traitement dure 13 mois et malgré ces traitements agressifs de chimiothérapie la probabilité de survie sans récurrence 2 ans après le début de l'immunothérapie est de 60% <sup>26</sup>.

La chimiothérapie joue un grand rôle dans le traitement du NB agressif. Historiquement, la probabilité de survie des patients du NB à haut-risque n'excédait pas 15% et elle a augmenté proportionnellement à l'intensité de la chimiothérapie <sup>49</sup>. La thérapie de soutien a beaucoup facilité l'augmentation de l'agressivité des traitements <sup>50</sup>. Dans les années 1970, la Vincristine combinée à la Cyclophosphamide, deux agents anticancéreux classiques, démontrait un effet considérable dans les phases précoces du traitement, cependant, toutes les tumeurs récidivaient 3 à 4 mois plus tard indiquant que les cellules du NB acquièrent une résistance plus rapidement que les autres tumeurs pédiatriques <sup>50</sup>. Puisque ces cellules tumorales sont résistantes à la chimiothérapie conventionnelle, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques devient donc indispensable. Ainsi, ces dernières années de recherches accrues ont permis l'avancement de l'immunothérapie et le développement de plusieurs inhibiteurs de petites molécules qui feront l'objet des prochains paragraphes.

## **1.6.2 Les nouveaux agents thérapeutiques**

### ***Immunothérapie***

La combinaison de la thérapeutique standard associée à l'immunothérapie a permis d'augmenter de 20% la survie des patients atteints de NB à haut risque, la passant ainsi de 40 à 60% <sup>26</sup>. En effet, les cellules de NB expriment l'antigène disialoganglioside (GD2) et l'anticorps monoclonal chimérique 14.18 (ch14.18) dirigé contre ce dernier possède une

activité anti-tumorale. GD2 est uniformément exprimé sur la surface des cellules du NB la rendant ainsi une cible parfaite pour l'immunothérapie. Une régression tumorale significative se produit lorsque l'anticorps ch14.18 est combiné au facteur stimulant des colonies de granulocytes et macrophages (GM-CSF : *Granulocyte macrophage colony stimulating factor*) ou à l'interleukine-2 (Il-2). Ainsi, cette immunothérapie a pour but de prévenir les rechutes chez les patients atteints de NB <sup>50</sup>. Des études de phase II de l'anticorps ch14.18 en combinaison avec Il-2 menées par le *Children's Oncology Group* (COG) démontrent une réponse complète chez 21.7% des patients <sup>51</sup>. Ainsi, comme nous venons de le voir, cette thérapie est maintenant couramment utilisée en clinique.

### ***Inhibiteur de petites molécules***

Au cours de la dernière décennie, plusieurs études approfondies sur la biologie de la pathogenèse du NB ont permis de découvrir un large éventail de nouvelles cibles thérapeutiques. Plusieurs agents ont ainsi été identifiés et certains se montrent prometteurs dans les modèles précliniques <sup>2</sup>. Un de ces exemples inclut la découverte de la mutation du gène *ALK* qui est retrouvée dans près de 15% des NB sporadiques à haut risque <sup>1</sup>. Cette tyrosine kinase active plusieurs transducteurs de signal tel que PLC $\gamma$ , PI3K/AKT, STAT3 et RAS <sup>50</sup>. Crizotinib, un inhibiteur d'ALK, inhibe significativement la croissance des cellules tumorales du NB *in vitro* et une immunothérapie contre ALK est aussi en cours de développement<sup>50</sup>. On retrouve également une surexpression du gène *Aurora A* dont l'expression corrèle avec l'agressivité du NB <sup>52</sup>. MLN8237, un inhibiteur d'Aurora A, a démontré son efficacité dans les études précliniques et sera introduit en étude de phase I et II par le COG <sup>1,53</sup>. L'étude de deux autres inhibiteurs de petites molécules a été l'objectif de mon mémoire et seront vus en détail dans le chapitre suivant.

## Chapitre 2 : Les inhibiteurs de PARP et de Bcl-2

### Les inhibiteurs de PARP

#### 2.1 PARP dans la cellule

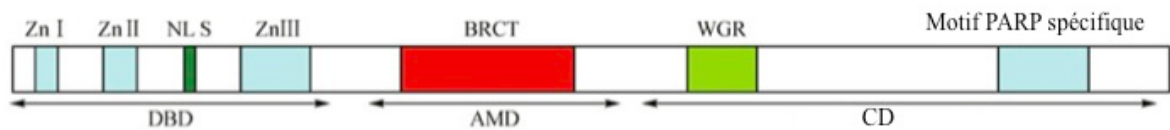
Dans la cellule humaine, on dénombre 17 protéines membres de la famille PARP (*poly(ADP-ribose) polymerases*)<sup>54</sup>. Parmi ceux-ci on retrouve les polymérases PARP-1, PARP2, PARP3, PARP4 et TNKS (aussi connue sous le nom de tankyrase1) qui possèdent une activité poly(ADP-ribosyl)ante, leur permettant de convertir la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) en molécule d'ADP ribose (*Poly-ADP Ribose (PAR)*) sur des protéines cibles, les transformant ainsi en protéine poly(ADP-ribosyl)er (*Poly(ADP-robosyl)ated or PARylated*)<sup>45</sup>.

La Poly(ADP-ribosyl)ation des protéines, tout comme l'ubiquitination et la phosphorylation est une forme commune de modification post-translationnelle. Elle participe à plusieurs processus métaboliques tels que la reconnaissance et la réparation d'ADN endommagé, la transcription, la mort cellulaire programmée et la mitose<sup>55</sup>. Ces branches PAR ont une très forte charge négative et modifient la structure tri-dimensionnelle des protéines, affectant ainsi leurs fonctions et leurs interactions avec les autres protéines et l'ADN<sup>55</sup>.

PARP-1 est la première protéine de cette famille de polymérase à avoir été découverte. Elle est retrouvée en abondance dans le noyau et possède un domaine composé d'un signal de localisation nucléaire (NLS : *nuclear localization signal*). PARP-1 possède trois domaines fonctionnels (Figure 3): le domaine liant l'ADN à la position N-terminal (DBD : *N-terminal DNA binding domain*), le domaine d'automodification central (AMD : *central*



*automodification domain*) et le domaine catalytique à la position C-terminale (CD : *C-terminal catalytic domain*). Le DBD contient 3 motifs en doigt de zinc. Les deux premiers (Zn I et Zn II) participent à la reconnaissance de bris double brins (DSB) et simple brin (SSB) et facilitent la liaison de PARP-1 à l'ADN. Le troisième motif (Zn III) n'est pas impliqué dans cette liaison mais jouerait plutôt un rôle dans la régulation du DBD sur le CD<sup>56,57</sup>.



**Figure 3 : Représentation schématique de PARP-1.** Zn : motif doigt de Zinc ; NLS : signal de localisation nucléaire ; BRCT : the breast cancer suppressor protein-1 (BRCA-1) C-terminal domain ; WGR : domaine avec un motif conservé (W/G/R) ; DBD : domaine de liaison à l'ADN ; AMD : domaine d'automodification centrale; CD: domaine catalytique. *Illustration adaptée de*<sup>55</sup>.

On retrouve dans l'AMD des résidus spécifiques de glutamate et de lysine, qui servent de récepteurs pour les facteurs d'ADP-ribose. Il contient aussi un domaine BRCT qui permet l'interaction avec plusieurs protéines réparatrice d'ADN endommagé. Le domaine CD renferme un motif spécifique à PARP, qui forme le site actif et lie le  $\text{NAD}^+$ , ainsi qu'un motif WGR. Bien que la fonction du motif WGR reste encore inconnue, le domaine CD catalyse la formation du PAR<sup>58</sup>.

Plusieurs formes de dommage à l'ADN activent PARP qui peut ensuite catalyser la Poly(ADP-ribosylation) de plusieurs protéines, incluant elle-même, les histones, la topoisomérase I (TOP I), la protéine kinase DNA-dépendante (DNA-PK) et plusieurs autres, initiant ainsi des interactions protéiques<sup>59</sup>. Suite à un stress génotoxique, PARP-1 catalysera 75 à 95% des branches PAR<sup>60</sup>.

PARP-1 peut être dégradé de deux manières: par ubiquitination et hydrolyse par le protéasome ou par la voie des caspases. La voie des protéasomes est favorisée sous certaines conditions, comme le choc thermique (*heat-shock*). Lors de l'apoptose, PARP-1 est clivé par les caspases en 2 fragments: un fragment liant l'ADN (24kDa) et un fragment initiateur d'apoptose (89kDa)<sup>61,62</sup>. Ce clivage de PARP est l'un des marqueurs les plus précoces utilisés pour détecter l'apoptose dans une cellule. Dans le NB, le clivage de PARP a été utilisé pour démontrer que l'apoptose était plus fréquente dans les tumeurs de dépistage systématique que dans les tumeurs dépistées cliniquement<sup>63</sup>.

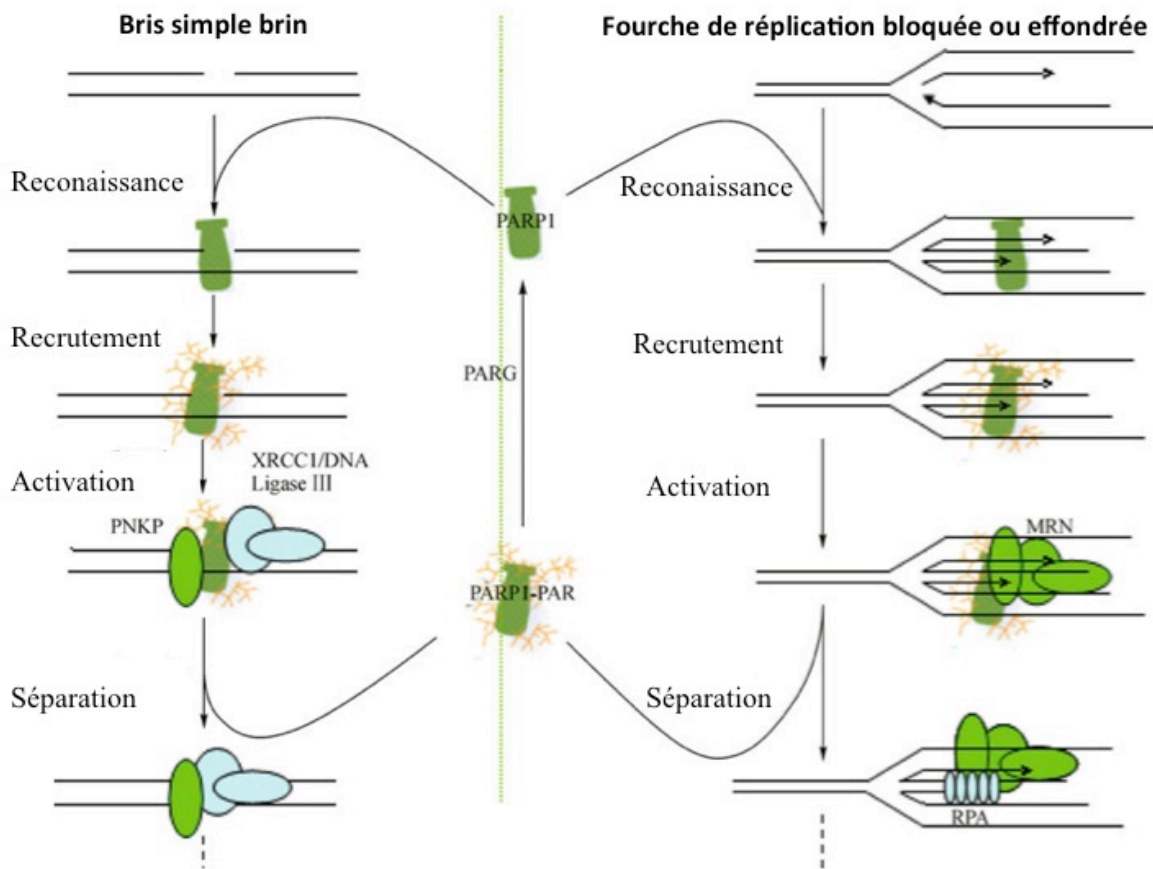
## **2.2 Fonction de PARP-1 dans la réparation d'ADN**

PARP-1 est une protéine jouant un rôle majeur dans la reconnaissance des bris d'ADN et sa liaison au DSB ou SSB enclenchera son activation<sup>64</sup>. Elle catalysera ensuite la formation de branches de PAR sur certaines protéines cibles permettant ainsi le recrutement des protéines réparatrices d'ADN sur les chromatides endommagés. PARP est impliqué dans deux mécanismes de réparation : la réparation par excision de bases (BER : *Base Excision Repair*) et la réparation homologue (HR : *Homologous Repair*).

### **2.2.1 Rôle de PARP-1 dans la réparation BER**

Le rôle de PARP-1 dans le mécanisme de réparation BER est très bien décrit dans la littérature (Figure 4 : à gauche). En effet, lorsque des bris simples brins surviennent à la suite d'une irradiation ionisante (IR) ou d'une réaction au contact de dérivés réactifs de l'oxygène (radicaux libres, stress oxydatif) (ROS : *Reactive Oxygen Species*), ils sont immédiatement reconnus par les deux motifs doigts de zinc dans le DBD de PARP-1<sup>65</sup>. Suite à cette liaison, PARP-1 sera activé et enclenchera la synthèse et le transfert de PAR sur elle-même et sur d'autres protéines cibles. Cette interaction entre les charges négatives de PAR sur les histones et l'ADN permet une relaxation dans la structure de chromosomes

et cette nouvelle conformation facilite l'entrée des protéines réparatrices telles que XRCC1/DNA ligase III, PNKP et autres <sup>66</sup>. Cette forte charge négative entre les branches de PAR et l'ADN mènera éventuellement à la dissociation de PARP-1 dont les branches seront hydrolysées par la protéine PARG (*poly(ADP-ribose) glycohydrolase*). Ainsi, PARP-1 sert comme capteur de dommages permettant l'assemblage et le recrutement des autres protéines nécessaires à la réparation BER.



**Figure 4 : Illustration du mécanisme de réparation de bris d'ADN:** Réparation par excision de base à gauche et réparation homologue à droite. *Illustration adaptée de* <sup>55</sup>.

### 2.2.2 Rôle de PARP-1 dans la réparation HR

Le HR est un mécanisme essentiel à la réparation précise de DSB en utilisant

comme modèle la chromatide sœur non endommagée. Les DSB sont reconnus par le complexe Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) qui, suite à son recrutement, utilise son activité nucléase comme première étape dans la réparation des bris. La protéine ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) sera ensuite activé et phosphorylera la variante histone H2Ax. Ce H2Ax phosphorylé ( $\gamma$ H2Ax) est le premier signal nécessaire à l'accumulation et le recrutement des autres protéines de réparation aux DSB. Bien que le rôle global de PARP-1 dans ce mécanisme de réparation n'est pas bien défini, plusieurs données récentes montrent que PARP-1 est nécessaire à la réparation HR<sup>67</sup>. Les cellules sous-exprimant PARP-1 ont montré une activité kinase d'ATM réduite ainsi qu'une réduction des foyers (foci) H2Ax, indiquant un rôle de PARP-1 dans l'activation d'ATM et la réparation HR<sup>68</sup>. Des études ont aussi montré l'implication de PARP-1 dans le recrutement de Nbs1 aux DSB<sup>66</sup>. Son inactivation réduit significativement le recrutement de Mre11 aux fourches de réplication bloquées, et ralentit le redémarrage de la réplication. De plus, la formation des foyers de RPA et Rad51, deux autres protéines nécessaires à la réparation HR, sont aussi significativement réduites<sup>69</sup>. Ainsi, cette étude suggère que PARP-1 détecterait la perturbation initiale des fourches de réplifications et attirerait le complexe MRN, dont l'activité nucléase est nécessaire à l'initiation du mécanisme de réparation HR (Figure 4: à droite).

### 2.3 PARP-1 dans la cancérogénèse

Le développement tumoral survient suite à l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques dans les cellules et la présence d'une instabilité génomique accélère significativement cette progression. Des études ont démontrées que l'inhibition de PARP-1 pouvait induire la différenciation des cellules épithéliales et des cellules hématopoïétiques<sup>70,71</sup>. De plus, lorsque des souris *knock out* pour PARP-1 sont traitées avec un agent alkylant, on retrouve une augmentation significative du nombre d'hémangiomes et hémangiosarcomes du foie ainsi que du nombre d'adénomes du

poumon<sup>72</sup>. Chez les humains, l'inhibition de PARP-1 est retrouvée dans plusieurs lignées cellulaires gastriques et du colon ainsi que dans certaines tumeurs du sein<sup>73,74</sup>.

#### **2.4 Fonctions du PARP inhibiteur comme agent anticancéreux**

PARP-1 est une protéine nécessaire au bon fonctionnement de plusieurs mécanismes de réparation d'ADN et maintient ainsi l'intégrité du génome. Le site de poly(ADP-ribosyl)ation des protéines est une cible de choix pour le développement de nouveaux agents anticancéreux car la fonction essentielle de PARP-1 dans la cellule dépend de cette activité enzymatique. Nous retrouvons présentement plusieurs inhibiteurs de PARP (PARPi) et certains démontrent une activité antitumorale prometteuse (Tableau V).

**Tableau V : Inhibiteurs de PARP en développement.**

Structure chimique	Thérapeutique	Stage de développement
Benzamide	BSI-201 (iniparib)	Phase III Gemcitabine et Caboplatin ±BSI-201 dans les cancer du sein et du poumon; Phase I/II en monothérapie ou en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques dans plusieurs cancers dont le gliome et le cancer de l'ovaire
Phthalazinone	AZD2281 (olaparib)	Phase I/II en monothérapie ou en combinaison avec des agents anticancéreux dans plusieurs cancer dont le cancer du sein, de l'ovaire et le cancer colorectal.
Tricyclic indole	AG-014699 (PF-01367338)	Phase II Utilisé en monothérapie dans le cancer du sein et de l'ovaire ayant une mutation BRCA; Phase I en combinaison avec des agents anticancéreux dans les tumeurs solides
Benzimidazole	ABT-888 Veliparib	Phase II Combinaison avec la chimiothérapie dans plusieurs cancers incluant le cancer du sein, cancer colorectal, glioblastome multiforme et mélanome. Phase I en combinaison avec la radiothérapie
Indazole	MK-4827	Phase I Combinaison avec agents à base de carboplatin
Pyrolocarbazole	CEP-9722	Phase I Combinaison avec témozolomide dans les tumeurs solides avancées
Phthalazinone	E7016 (GPI-21016)	Phase I Combinaison avec témozolomide dans les tumeurs solides avancées
Isoindolinone	INO-1001	Phase I Combinaison avec témozolomize dans les mélanomes (complété) sans investigation future en oncologie; Phase II dans les maladies cardiovasculaires
Structure non-divulguée	MP-124	Phase I dans les AVC ischémiques aigus
Structure non-divulguée	LT-00673	Préclinique
Structure non-divulguée	NMS-P118	Préclinique
Structure non-divulguée	XAV939	Préclinique (très grande sélectivité pour PARP-5 (tankyrase))

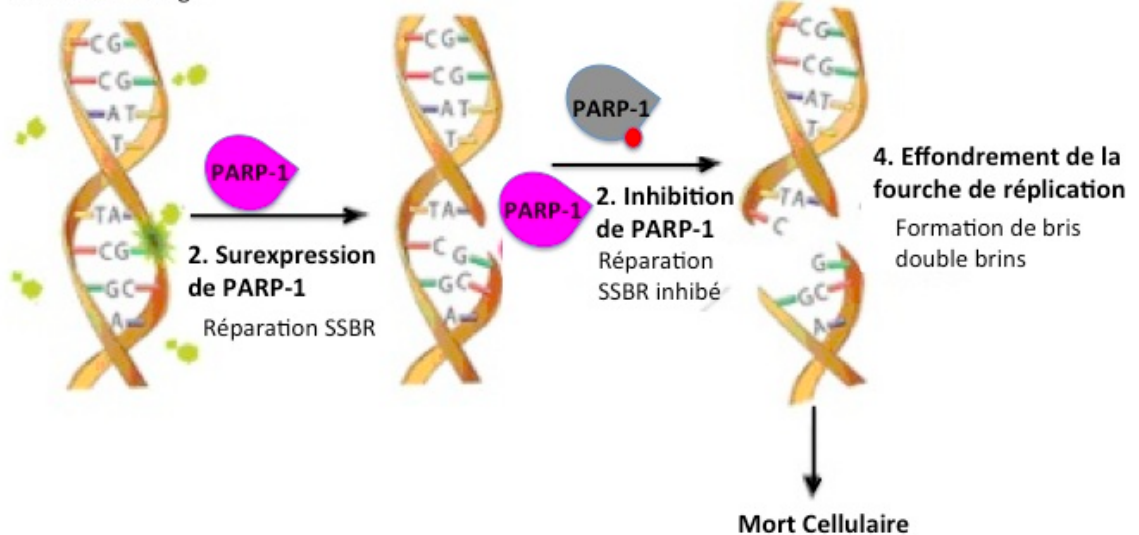
Tableau adapté de <sup>75</sup>.

Le développement et l'utilisation clinique des PARPi sont basés sur deux raisonnements distincts. Premièrement, inhiber PARP-1 potentialiserait les effets de la chimiothérapie et de la radiothérapie et pourrait surmonter la chimiorésistance <sup>76</sup> (Figure 5). Deuxièmement, PARPi peut être utilisé en monothérapie chez les patients ayant déjà un mécanisme de réparation déficient. Ceci mènerait à un phénomène appelé létalité synthétique (*Synthetic lethality*), une mort cellulaire qui survient lorsque deux mutations non-létales se retrouvent simultanément dans la même cellule <sup>77</sup>. Par exemple, cette létalité synthétique est souvent

retrouvée chez les tumeurs BRCA-mutées, qui démontrent une grande sensibilité aux PARPi. Les gènes BRCA1 et BRCA2 sont deux protéines nécessaires à la régulation du mécanisme de réparation HR<sup>78</sup>. Ainsi, puisque ces tumeurs BRCA1/2 mutées ne peuvent plus réparer leurs DSB et, qu'en rajoutant un PARPi on prévient la réparation de SSB, on retrouvera alors une accumulation de dommage à l'ADN, une instabilité génomique et augmentation de mort cellulaire.

### 1. Chimiothérapie/Radiothérapie

ADN endommagé



**Figure 5 : Inhibition de PARP-1 cause la réparation anormale de SSB.** Des bris d'ADN sont causés par les agents anticancéreux. L'inhibition de PARP-1 cause des SSB continus, qui, lorsque rencontrés par les fourches de réplifications, provoquent leur effondrement engendrant ainsi des DSB. Dans le cas d'un trop grand nombre de SSB non réparés, il y aura une accumulation des fourches de réplification effondrées et de DSB dans le noyau. Ainsi, les cellules, incapables de maintenir l'intégrité de leur génome, mourront. SSB: bris simple brin; DSB: Bris double brins. *Illustration adaptée de [www.pharmastrategyblog.com](http://www.pharmastrategyblog.com).*

### 2.5 L'utilisation de PARPi en thérapie combinée

La majorité des agents anticancéreux présentement utilisés en clinique sont

généotoxiques. Ainsi, les cellules tumorales activent les différents mécanismes de réparations d'ADN ce qui permettrait le développement de leur chimiorésistance. Puisque PARP-1 joue un rôle crucial dans plusieurs de ces mécanismes de réparations, son inhibition permettrait la sensibilisation des cellules tumorales à ces traitements, améliorant ainsi leur index thérapeutique. Ce raisonnement a été le fondement de notre étude d'un PARPi, AG-014699 (AG), dans le NB.

### 2.5.1 AG

AG a été étudié en combinaison avec l'agent alkylant Témzolomide dans plusieurs tumeurs solides <sup>79</sup>. Les études ont montré que cette combinaison a potentialisé les effets antitumoraux du Témzolomide et cette association est présentement étudiée comme traitement dans les mélanomes métastatiques, le glioblastome multiforme, les tumeurs solides avancées, les tumeurs solides réfractaires et les lymphomes. Ce PARPi est aussi utilisé en association avec le Cis, un agent génotoxique à base de platine, dans les tumeurs mammaires BRCA2-mutées <sup>75</sup>. Dans les cellules tumorales ovariennes résistantes au Cis, une association avec le PARPi re-sensibiliserait la tumeur à cet agent chimiothérapeutique <sup>55</sup>. On retrouve également des études de Phase I et II qui évaluent ce PARPi comme radiosensibilisateur dans le traitement des cancers de la tête et du cou et des néoplasmes du système nerveux central <sup>60</sup>. Dans le NB, ce PARPi est utilisé en combinaison avec le Témzolomide, le Topotécan et le 131I-Metaiodobenzylguanidine (131I-MIBG) et potentialiserait leur toxicité dans les cellules <sup>80,81</sup>.



## Les inhibiteurs de Bcl-2

### 2.6 Bcl-2 dans la cellule

Bcl-2 a été initialement découvert dans les lymphomes de type folliculaire ; sa surexpression, causée par la translocation entre les chromosomes 14 et 18 (t(14;18)), contribuait au développement du néoplasme en inhibant l'apoptose des cellules B <sup>82</sup>. Aujourd'hui, la famille Bcl-2 compte une vingtaine de membres <sup>83</sup>. Toutes les protéines de cette famille contiennent au moins 1 des 4 motifs BH conservés (BH : *Bcl-2 homology*) (BH1-BH4) <sup>84</sup>. Nous pouvons diviser ces membres en trois groupes. On retrouve dans le premier groupe des protéines inhibitrices d'apoptose, soit Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-B et A1, qui contiennent les 4 domaines BH. On retrouve ensuite les protéines pro-apoptotique que l'on divise en deux groupes: les protéines possédant 3 domaines BH (Bax, Bak et Bok); et les protéines à domaine BH3-unique (Bad, Bid, Bim, Bmf, Bik, Hrk, Noxa, Puma). Le domaine conservé de ce dernier sous-groupe sert à lier et inhiber les protéines Bcl-2 anti-apoptotique pour enclencher la cascade apoptotique <sup>85</sup>.

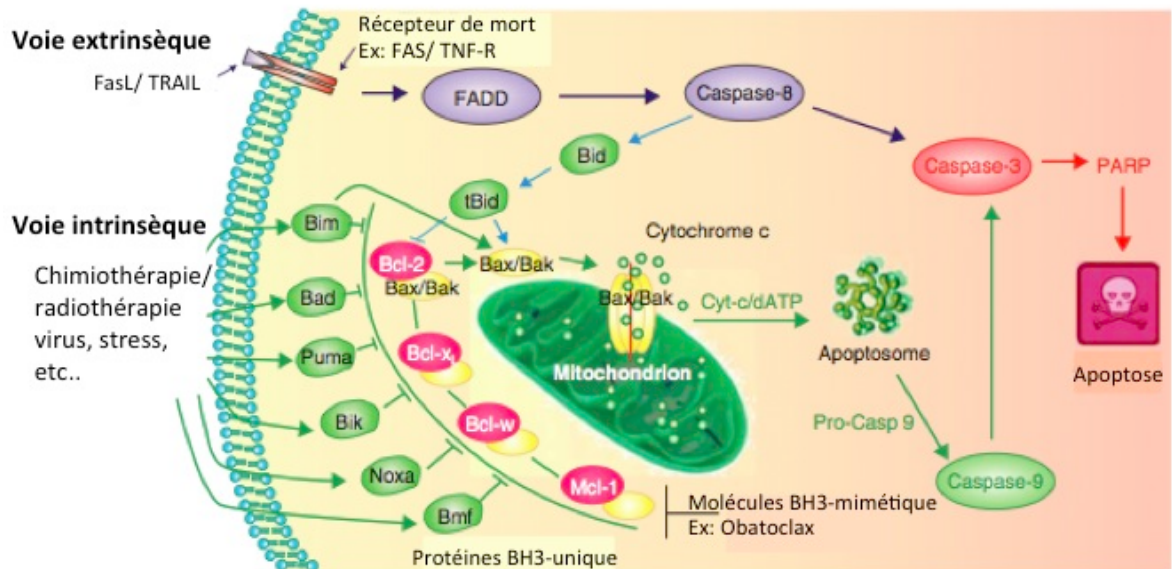
### 2.7 L'apoptose

L'apoptose ou la mort cellulaire programmée est un processus métabolique essentiel à la régulation normale de la survie cellulaire. Dans un organisme, une grande partie de cette mort cellulaire naturelle est régulée par la voie apoptotique. Ainsi, un mécanisme de mort défectueux mènerait à l'accumulation néfaste de cellules indésirables. C'est une régulation délicate de cette mort cellulaire programmée qui est la base de l'homéostasie. Or, la majorité des cancers humains semblent avoir une machinerie apoptotique mutée ou dérégulée.

L'apoptose survient en réponse à la perturbation d'une des deux voies métaboliques inter-reliées. La voie mitochondriale, ou voie intrinsèque, répond à des stress intracellulaires tels que le stress génotoxique, l'hypoxie, la carence en facteurs de croissance ou aux toxines,

comme les agents chimiothérapeutiques. Cette perturbation de l'homéostasie créera un changement de perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP : *Mitochondrial outer membrane permeability*) qui libérera le cytochrome C et autres facteurs médiateurs d'apoptose pour enclencher la suite de la cascade apoptotique <sup>86</sup>. La voie extrinsèque, ou voie cytoplasmique répond, quant à elle, à des signaux activateurs des récepteurs de mort comme la famille Fas (Fas, TRAIL, TNF- $\alpha$  et autres). L'activation de n'importe lequel de ces récepteurs entraîne l'activation directe des caspases, une enzyme protéolytique qui déclenche la digestion des protéines intracellulaires et ultimement l'ADN.

Bax et Bak facilitent l'initiation de la voie de mort cellulaire programmée en promouvant la perméabilité mitochondriale et la relâche de protéines pro-apoptotiques. Les protéines anti-apoptotiques interagissent, via leur domaine BH3, avec Bax et Bak et inhibent leur activité perméabilisante. Les protéines BH3-unique inhibent, quant à elles, les protéines anti-apoptotiques <sup>86</sup>. La direction, ou non, vers l'apoptose est régulée par le ratio de protéines pro-apoptotique (Bax) et anti-apoptotique (Bcl-2) <sup>87</sup>. Un excès de Bcl-2 détermine la survie cellulaire, alors qu'une diminution détermine la mort cellulaire de la cellule. Dans la cellule normale, Bax et Bak existent sous forme de monomères. Lorsqu'un signal de mort est transmis par les protéines BH3 uniques, elles se lient et séquestrent les protéines pro-survie Bcl-2 qui relâchent, à leur tour, les protéines Bax/Bak. Ainsi, Bax/Bak s'oligomérisent pour former un pore et s'insèrent dans la membrane mitochondriale externe. Ce pore membranaire enclenche une perte de potentiel de la mitochondrie et entraîne la sortie du cytochrome C. Le cytochrome C se lie alors à APAF-1, caspase-9 et dATP/dADP et forment l'apoptosome. La formation de cet apoptosome enclenchera la suite de la cascade apoptotique en activant les caspases. Ainsi, ces protéines anti-apoptotiques Bcl-2 jouent un rôle indispensable dans la régulation de l'apoptose initiée par Bax et Bak. Bien que cette cascade de signalisation soit complexe, une illustration simplifiée de ces interactions est montrée à la figure 6.



**Figure 6 : Interaction simplifié des membres de la famille Bcl-2.** La stimulation des récepteurs de mort par leur ligand respectif entraîne leur activation et leur oligomérisation suivis du recrutement de la protéine adaptatrice FADD et de la Caspase-8. La Caspase-8 active à son tour la caspase effectrice Caspase-3. Cette dernière enclenche le reste de la cascade apoptotique. Caspase-8 active aussi la protéine BH3-unique Bid qui peut, à son tour, inhiber les protéines anti-apoptotique et faciliter l'oligomérisation de Bax/Bak. La voie intrinsèque est activée, entre autres, par la chimiothérapie, la radiothérapie et le stress. Ainsi, les protéines BH3-unique sont activées et inhibent les protéines anti-apoptotique. En condition normale, ces dernières séquestrent Bax/Bak mais suite à leur inactivation Bax/Bak s'oligomérisent et s'insèrent dans la membrane externe de la mitochondrie. La libération du cytochrome c active la Caspase-3 suite à la formation de l'apoptosome. *Illustration adaptée de* <sup>88</sup>.

### 2.7.1 L'apoptose et le développement tumoral

Un mécanisme d'apoptose non régulé peut causer la survie de cellules non-désirées ou la mort inappropriée de cellules normales. Ceci est à la base d'une multitude de pathologies incluant les maladies auto-immunes, les maladies dégénératives et les cancers <sup>89</sup>. En effet, une apoptose défectueuse causant l'immortalité cellulaire est maintenant considérée comme étant le fondement de la plupart, sinon de tous, les cancers <sup>90</sup>. Les études démontrent qu'une dérégulation de la protéine Bcl-2, comme événement oncogénique

primaire (initiateur) ou secondaire (promoteur), est cruciale pour le développement, la maintenance et la chimiorésistance des tumeurs <sup>91</sup>.

Comme il a été mentionné précédemment, Bcl-2 est surexprimé dans les lymphomes folliculaire de type B en raison d'une translocation chromosomique t(14;18) retrouvée chez 90% des patients. Sa surexpression a aussi été retrouvée dans les leucémies lymphocytaires chroniques, les lymphomes diffus à grandes cellules B et les lymphomes du manteau <sup>92-94</sup>. Des hauts niveaux de Bcl-2 sont aussi retrouvés dans plusieurs tumeurs solides telles que celles du cerveau, du sein, du poumon et du système nerveux périphérique comme pour le NB <sup>95,96</sup>. Cette surexpression de Bcl-2 a été corrélée à l'amplification génique, à l'hypométhylation du promoteur et à une délétion chromosomique causant la perte des microARN 15a et 16-1 nécessaires à l'inhibition de Bcl-2 <sup>92,97,98</sup>.

Réciproquement, les cellules tumorales peuvent évader la mort cellulaire en surexprimant d'autres protéines pro-apoptotiques comme Bcl-xL. En effet, les myélomes multiples montrent une surexpression de la protéine Bcl-xL <sup>99</sup>. Bcl-xL est aussi impliqué dans la chimiorésistance des leucémies myéloïdes chroniques Bcr/Abl. La tyrosine kinase oncogénique Bcr-Abl active plusieurs voies de signalisation dont le facteur de transcription STAT5. STAT5, connu pour avoir un rôle majeur dans la transformation cellulaire, est un activateur de Bcl-xL <sup>100</sup>. On dénombre aussi une multitude de cancers qui présentent une augmentation du nombre de copies de Bcl-xL comme certaines tumeurs du poumon et des os <sup>101</sup>.

La surexpression d'une autre protéine anti-apoptotique, soit Mcl-1, est retrouvée dans plusieurs tumeurs hématologiques et tumeurs solides comme le myélome multiple, la leucémie myéloïde chronique et le cholangiocarcinome <sup>102,103</sup>. Des études récentes indiquent une augmentation du nombre de copies de Mcl-1 dans certains cancers du poumon et du sein et que l'utilisation des ARN interférants (RNAi) dans leurs lignées cellulaires respectives diminuent significativement leurs survie et leur prolifération *in*

*vitro*<sup>101</sup>. En conclusion, ces résultats fournissent une preuve que la surexpression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 jouerait un rôle critique dans la survie et l'expansion tumorale et pourrait être un obstacle majeur à la réussite des traitements anticancéreux.

## 2.8 Bcl-2 dans le NB

Les études *in vitro* démontrent que Bcl-2 est hautement exprimé dans les NB ; son expression est inversement proportionnelle au nombre de cellules en apoptose et au niveau de différenciation de la tumeur<sup>96</sup>. Aussi, une surexpression de Bcl-2 dans les lignées cellulaires du NB est associée à la chimiorésistance<sup>104</sup>. La présence de Bcl-2 est également corrélée à une histologie non favorable, à une amplification de *MYCN* et à un mauvais pronostic<sup>104,105</sup>. Parallèlement, d'autres études suggèrent que l'augmentation de l'expression des caspases dans les NB est associée aux facteurs pronostiques biologiques favorables et à un meilleur taux de survie<sup>106</sup>.

## 2.9 Inhibiteur de Bcl-2 comme thérapie anticancéreuse

Le rôle indispensable que joue la famille de protéines anti-apoptotique Bcl-2 dans la survie des cellules tumorales a déclenché un grand intérêt pour le développement de molécules inhibitrices. Une des premières stratégies a été le développement d'oligonucléotides antisens qui inhibent l'expression des ARN messagers (mRNA) de Bcl-2<sup>107</sup>. Oblimersen est un oligonucléotide antisens dirigé contre le cadre de lecture (ORF : *open reading frame*) de Bcl-2<sup>108</sup>. Les effets de cette molécule ont montré peu de résultats en clinique et sa capacité de diminuer les niveaux protéiques de Bcl-2 *in vivo* reste encore nébuleuse<sup>109</sup>.

La deuxième stratégie a été d'antagoniser la fonction de Bcl-2. Ainsi, des petites molécules, qui miment l'action des protéines BH3-unique, ciblent directement et inhibent les protéines pro-survie. Par exemple, ABT-737 et ABT-263 sont deux molécules qui lient, avec une

grande affinité, les protéines Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w<sup>110</sup>. Tel qu'attendu, ces molécules requièrent la présence de Bax et Bak pour induire la mort cellulaire ; ceux-ci sont activés indirectement suite à l'inactivation des protéines pro-apoptotique Bcl-2 (Figure 6). Dans les études *in vitro*, ABT-737 utilisé en monothérapie, montre des effets anti-tumoraux significatifs dans les leucémies et les lymphomes, et, à des concentrations plus élevées, il induit l'apoptose dans les myélomes multiples et les cancers du poumon non à petites cellules (NSCLC)<sup>111</sup>. En effet, les cellules primaires de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique, leucémie myéloïde chronique, et des néoplasmes de cellules B sont extrêmement sensibles à l'ABT-737 et requièrent des concentrations d'une échelle nanomolaire<sup>111</sup>. Ainsi, une douzaine d'inhibiteurs sont en en étude pré-clinique et trois sont en étude de phase clinique. Celui qui a fait l'objet de ce mémoire est l'Obatoclox (Obx) que nous verrons plus en détail dans le paragraphe suivant.

### **2.10 Obx (GX 15-070)**

Obx est un inhibiteur trans-Bcl-2 ; il inhibe toutes les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et active ainsi la voie intrinsèque de l'apoptose. Les études précliniques *in vitro* ont montré une efficacité en monothérapie ou en association avec d'autres agents anticancéreux dans certains cancers du poumon, les lymphomes du manteau et les myélomes multiples<sup>112,113</sup>. Lorsque l'Obx est combiné à Apo2L/TRAIL, des ligands activateurs de la voie extrinsèque, on observe une augmentation de la mort cellulaire dans les cholangiocarcinomes et les cellules tumorales pancréatiques<sup>114</sup>. De plus, une combinaison avec les inhibiteurs de tyrosine kinase dans les cancers du sein et du poumon montre aussi un effet antitumoral marqué<sup>115</sup>.

Actuellement, l'Obx est étudié dans de multiples essais cliniques de phase I/II pour plusieurs tumeurs solides et hématologiques<sup>116,117</sup>. Pour les tumeurs hématologiques avancées, Obx en monothérapie a démontré un effet anti-tumoral dans les essais cliniques de phase I. Sa combinaison avec le Topotécane, chez les patients atteints de tumeurs solides,

a démontré une bonne tolérabilité <sup>118</sup>. Une évaluation de phase II est en cours pour évaluer le bénéfice d'une thérapie combinée, les effets secondaires et la meilleure dose d'Obx à donner en combinaison avec de la Vincristine, de la Doxo et de la Dexrazoxane chez les jeunes enfants atteints de leucémie, de lymphome ou de tumeurs solides réfractaires.

## Chapitre 3 : Les cellules souches cancéreuses dans le NB

Le concept qu'une sous-population de cellules, appelée cellules souches cancéreuses (CSC : *cancer stem cells*), serait à la base d'une multitude de tumeurs solides et hématologiques a remué beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique. En effet, ce modèle prédit que ces cellules sont à la base des rechutes tumorales et des métastases et seraient la cause des échecs de nos thérapies anticancéreuses. Bien que cette sous-population soit souvent très petite, elle aurait une capacité d'auto-renouvellement et de tumorigénicité pour recréer *in vivo* l'hétérogénéité tumorale initiale dans les souris xénotransplantées avec ces cellules. Compte tenu de ce potentiel tumoral élevé, la croyance est que la réponse initiale de la tumeur à la chimiothérapie conventionnelle reflète seulement la mort des cellules cancéreuses différenciées et que la destruction insuffisante des CSC mène à la rechute tumorale. Par conséquent, il devient impératif de comprendre les caractéristiques biologiques qui les distinguent afin de développer des agents anticancéreux innovateurs qui cibleraient spécifiquement ces cellules.

### 3.1 Le modèle stochastique et hiérarchique des CSC

Les études ont souvent démontré que les tumeurs sont composées de groupes de cellules hétérogènes. En effet, dans les modèles xéno greffes de souris, certaines fractions cellulaires peuvent soutenir une nouvelle croissance tumorale, alors que d'autres non <sup>119</sup>. Deux modèles concurrents ont été proposés pour expliquer cette hétérogénéité : le modèle stochastique et le modèle hiérarchique. Dans le modèle stochastique, l'hétérogénéité tumorale survient suite à une accumulation aléatoire d'évènements génétiques et épigénétiques et est influencé par le microenvironnement <sup>120</sup>. Ainsi, avec le temps, les CSC sont sélectionnées au hasard et chaque cellule tumorale qui reçoit les signaux appropriés a le potentiel de devenir une cellule souche. Inversement, le modèle hiérarchique soutient qu'une seule population distincte possède les caractéristiques de cellules souches et va promouvoir le développement tumoral <sup>120</sup>. Ce modèle suggère une organisation



hiérarchique de la tumeur et soutient que les CSC sont distinctes du reste des cellules tumorales et peuvent être isolées de celles-ci <sup>1</sup>.

La première preuve expérimentale de l'existence des CSC est survenue il y a une vingtaine d'année lorsque des cellules initiatrices de leucémie ont été enrichies par les marqueurs CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> de la leucémie myéloïde aigüe (AML). Une fois transplantée dans des souris immunosupprimées, cette population cellulaire était capable, à elle seule, de régénérer la AML <sup>121</sup>. Ce modèle *in vivo* a aussi permis de confirmer la tumorigénicité des populations de CSC dans plusieurs tumeurs solides incluant le sein, le colon, le poumon et le cerveau. En effet, il a été montré qu'aussi peu que 100 cellules mammaires avec le phénotype CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> pouvaient réinitialiser une tumeur dans les xénogreffes de souris, alors qu'une injection d'un demi million de cellules différenciées du reste de la tumeur ne produisaient aucun développement tumoral <sup>122</sup>.

### **3.2 Les marqueurs des CSC**

Une série d'études ont identifié plusieurs marqueurs de CSC. ALDH1, CD44, DCAMKL-1, LGR5, BMI1 et CD133 font partie, notamment, des marqueurs pouvant servir à l'isolement de cette sous population tumorale <sup>123-125</sup>. Nous avons utilisé, dans le cadre des études présentées dans ce mémoire, le CD133 comme marqueur de cellules souches.

#### **3.2.1 CD133**

Le CD133, ou Prominin-1, est une glycoprotéine possédant cinq domaines transmembranaires. Bien que sa fonction biologique reste encore inconnue, il a été démontré que des populations enrichies en CD133 (CD133<sup>+</sup>) auraient des caractéristiques semblables à celle des CSC. En effet, la population CD133<sup>+</sup> serait impliquée dans la maintenance des propriétés des cellules souches en inhibant leur différenciation <sup>123</sup>. Le marqueur CD133 a permis d'isoler, pour la première fois en 1997, des CSC

hématopoïétiques. Depuis, le CD133 a permis la séparation des CSC dans plusieurs tumeurs cérébrales, telles que le glioblastome multiforme, le médulloblastome et l'épendyome. Singh *et al.* a été le premier groupe à identifier le CD133 comme marqueur de CSC cérébrales<sup>126,127</sup>. À l'aide d'un anticorps dirigé contre le CD133, ils ont isolé les cellules CD133 positives de plusieurs tumeurs cérébrales et ont démontré que ces cellules avaient une capacité plus élevée de prolifération, d'auto-renouvellement et de différenciation. Depuis, ce marqueur a permis l'identification des CSC dans les cancers colorectaux, gastriques, pancréatiques ainsi que plusieurs autres cancers illustrés dans le Tableau VI.

**Tableau VI : Études ayant utilisé le marqueur CD133 pour isoler les CSC.**

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

Tableau adapté de<sup>128</sup>.

Dans le NB, des études effectuées dans notre laboratoire ont démontré l'importance du marqueur CD133 comme marqueur de cellules souches <sup>129</sup>. En effet, il a été illustré que les cellules exprimant le CD133 démontraient une croissance indépendante à l'ancrage et formaient plus de neurosphères que le reste des cellules différenciées de la tumeur. Aussi, une injection orthotopique de seulement 500 cellules CD133+ a été suffisante pour initier une croissance tumorale et développer des métastases chez nos souris. Par contre, l'injection de 500 cellules CD133- n'a engendré aucune tumeur.

### **3.3. La résistance des CSC aux traitements de chimiothérapies conventionnels**

Les échecs des traitements anticancéreux conventionnels sont expliqués par la présence de cellules tumorales ayant des propriétés de cellules souches. Ces cellules possèdent différents degrés de résistance à la chimiothérapie et la radiothérapie. Lors d'un traitement anti-tumoral, certaines cellules peuvent échapper à l'effet toxique de l'agent anticancéreux donné et peuvent développer des tumeurs secondaires ayant une sensibilité encore plus réduite aux traitements existants.

Les CSC CD133+ ont démontré une résistance aux traitements de chimiothérapie et de radiothérapie. En effet, une étude a prouvé que la séparation des CSC par le CD133 dans le glioblastome isolait une population cellulaire plus résistante aux agents anticancéreux standard comme le Témzolomide, le Carboplatine, le Paclitaxel et l'Étoposide <sup>130</sup>. De plus, il a été démontré que l'expression de CD133 est plus élevée dans les glioblastomes récurrents, illustrant ainsi leur résistance plus élevée malgré des thérapies agressives <sup>130</sup>. Dans les gliomes malins, la fraction cellulaire CD133+ augmentait *in vitro* et dans les modèles xéno greffes de souris, et ce, suite à une exposition à des doses croissantes de radiations <sup>131</sup>. Cette observation est en accord le modèle de radiorésistance accru des CSC. Le même phénomène est observé dans les CSC du sein où l'exposition à la radiation augmente la fraction cellulaire CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> <sup>132</sup>.

Afin d'éliminer cette population cellulaire et d'améliorer les traitements, plusieurs études ont tenté d'élucider les caractéristiques biologiques uniques de ces CSC. L'hypothèse courante est que les CSC auraient une résistance innée aux traitements car elles possèderaient des mécanismes de réparation d'ADN plus actifs, elles inhiberaient leur entrée en apoptose et elles auraient une surexpression accrue des transporteurs ABC<sup>133</sup>. Ainsi, les tumeurs renfermeraient une population de cellules pluripotentes qui seraient naturellement résistantes aux médicaments grâce à une surexpression de leurs transporteurs ABC. Contrairement au reste des cellules différenciées de la tumeur, ces CSC ne seraient jamais détruites. Ce modèle fournit un mécanisme par lequel certaines CSC échapperaient aux traitements et explique les rechutes tumorales, qui surviennent, bien souvent, des années plus tard<sup>133</sup>. En effet, il a été rapporté qu'une surexpression des transporteurs ABC est retrouvée dans les CSC d'une multitude de tumeurs<sup>134</sup>.

De plus, on a démontré que les gènes anti-apoptotiques tels que *Bcl-2* et *Bcl-xL* étaient surexprimés dans les CSC CD133+ alors que l'expression des gènes pro-apoptotiques comme *Bax* était inhibée dans le glioblastome<sup>135</sup>. Aussi, une surexpression de gène *Bcl-2* contribuerait à la résistance des CSC CD133+ du médulloblastome à la radiothérapie et à l'inducteur d'apoptose TRAIL<sup>136</sup>.

Les CSC des carcinomes hépatocellulaires démontrent une grande chimiorésistance à la Doxo, le Cis et la Hydroxycamptothécine. Ces cellules ont démontré une expression plus importante de PARP-1 et l'inhibition de ce dernier a potentialisé la sensibilité de ces CSC à ces agents thérapeutiques<sup>137</sup>. De plus, l'inhibition de PARP-1 dans les cancers du sein réduirait significativement la présence de CSC<sup>138</sup>.

Ainsi, comprendre quelle voie de signalisation règle le 'caractère souche' de ces CSC est important pour l'amélioration et le développement de nouvelles thérapies ciblées.

# Projet de recherche

## Chapitre 4

En résumé, le NB est la tumeur solide extra-crânienne la plus commune chez l'enfant et représente 8 à 10% de tous les cancers infantiles<sup>32</sup>. Le NB a une évolution très variable : cette tumeur peut régresser spontanément sans aucun traitement ou évoluer en métastase causant la mort. Le traitement du NB à haut risque est un véritable enjeu pour les cliniciens car ces tumeurs sont souvent résistantes aux thérapies conventionnelles. En effet, seulement 40% des enfants atteints de NB à haut risque survivent à la maladie, et ce, en dépit des traitements combinés très agressifs de chimiothérapie, de chirurgie, de transplantation autologue de moelle et de radiothérapie<sup>3,139</sup>. **Il est donc primordial de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'augmenter la survie des patients atteints de NB à haut risque.**

Des études ont démontré que le NB développe rapidement une chimiorésistance aux agents traditionnels<sup>50</sup>. Parallèlement, PARP-1 joue un rôle important dans la chimiorésistance de certaines tumeurs et son inhibition potentialiserait les cellules aux thérapies classiques<sup>137</sup>. Ainsi, PARP-1 représente une cible intéressante dans le traitement du NB.

De plus, il a été illustré que le gène *Bcl-2*, un gène anti-apoptotique, est fortement exprimé dans les lignées cellulaires<sup>140-142</sup> et les tumeurs primaires<sup>96,105,143-146</sup> de NB. L'expression de la protéine Bcl-2 est un facteur de mauvais pronostic dans le NB. De plus, cette protéine contribuerait à la résistance à la chimiothérapie<sup>104,141</sup>. Par conséquent, l'inhibition de Bcl-2 serait aussi une thérapie anti-cancéreuse à explorer dans le NB.

#### **4.1 Objectifs de recherche**

Le principal objectif de recherche de ce mémoire est de déterminer les effets de deux nouveaux médicaments inhibiteur de PARP-1 et de Bcl-2, AG et Obx respectivement, sur la croissance du NB et des CSC du NB *in vitro*.

Les objectifs secondaires seront de caractériser l'effet de ces deux inhibiteurs en combinaisons avec d'autres agents thérapeutiques classiques utilisés dans le traitement du NB et d'élucider les voies intracellulaires qui sont modifiées.

#### **4.2 Stratégie expérimentale**

Afin de réaliser les perspectives de recherche de ce mémoire, nous avons eu recours à diverses techniques expérimentales *in vitro* et *in vivo*. Voici un bref résumé des principales stratégies utilisées pour mener à bien les résultats présentés dans ce mémoire.

# Matériel et méthodes

## Chapitre 5

### 5.1 Lignées cellulaires de NB

Les cellules SK-N-DZ, SK-N-SH et SK-N-FI proviennent de NB métastatiques avec des métastases dans la moelle osseuse. Elles ont été obtenues de l'*American Type Culture Collection* (ATCC). Les cellules NB-10 proviennent de l'Hôpital St. Jude (Memphis, TN, É.-U.) et elles dérivent de métastases hépatiques. Les cellules N91 et NB8 proviennent de l'Institut Gustave-Roussy (Villejuif, France) et dérivent de métastases de la moelle osseuse. Des études préliminaires réalisées dans le laboratoire à l'aide de SNP array, nous ont permis de mieux comprendre les anomalies génétiques contenues dans ces différentes lignées cellulaires (Tableau VII).

La lignée SK-N-DZ contient une amplification *MYCN*, un gain chromosomique 17q ainsi qu'une LOH 1p et 11q. Les NB8 et N91 contiennent toutes deux l'amplification *MYCN*, la LOH 1p et la perte chromosomique 17q. Les SK-N-FI contiennent le gain 17q et la LOH 11q. Les SK-N-SH contiennent le gain 17q et la LOH 1p. Les NB10 contiennent l'amplification *MYCN*, le gain 17q et la LOH 1p. Les cellules sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée composée de 95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub> et sont mises en culture dans un milieu approprié contenant du DMEM supplémenté avec 1% pénicilline / streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal (SVF).

**Tableau VII : Anomalies génétiques des différentes lignées cellulaires de NB**

Lignées cellulaires	Changement chromosomique				
	amplification <i>MYCN</i>	LOH 1p	LOH 11q	Perte 17q	Gain 17q
SK-N-DZ	X	X	X		X
SK-N-SH		X			X
SK-N-FI			X		X
NB10	X	X			X
N91	X	X		X	
NB8	X	X		X	

## 5.2 Tumeurs

Cent trente-deux tumeurs primaires de NB ont été utilisées pour les études d'immunohistochimie. Ces tumeurs, provenant de patients qui ont été suivis à CHU Sainte-Justine entre mars 1994 et février 2009, sont de stade 1,2,3,4 ou 4s selon les critères de l'INSS <sup>147</sup>. Tous les échantillons de tumeurs ont été fixés et inclus en paraffine. Des tissus micro-arrays (TMA) ont été réalisés à l'aide de 4 prélèvements de 0.6 mm de diamètre par tumeur de patients en plus de métastases et de tissu normal lorsqu'ils étaient disponibles. Cette étude a été approuvée par des comités d'évaluation scientifique et d'éthique de la recherche du CHU Sainte-Justine (acceptation du protocole #401). Les investigateurs ont obtenu un consentement éclairé et l'accord des patients ainsi que de leurs parents.

## 5.3 Cytométrie de flux

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

## 5.4 Études *in vivo*

Afin de valider nos études *in vitro* nous avons procédé à des études *in vivo*. En accord avec le comité animal du CHU Sainte Justine, le protocole 467 a été approuvé le 30 janvier 2012. Les souris humanisées NOD/SCID  $\gamma$ - (NOD/SCID : *Non-obese diabetic, severe combined immunodeficient*) ont été utilisées. Les injections ont été faites de manière chirurgicale à l'animalerie du CHU sainte-Justine par le Dr. Mona Beaunoyer. Un million



( $1 \times 10^6$ ) de cellules SK-N-DZ sont ensuite greffées en orthotopique dans la glande surrénale gauche des souris, site majeur de développement du NB. Un suivi clinique des souris (poids, signes vitaux, comportement) est effectué une fois par semaine. Au jour 18 suivant la greffe des cellules SK-N-DZ, une dose d'Obx (3 mg/kg/jour)<sup>148</sup>, utilisé seul ou en combinaison avec le Cis (8 mg/kg/jour)<sup>149</sup>, est injectée aux souris NOD/SCID par la voie intra-péritonéale pendant 5 jours consécutifs. Les souris contrôle ont été injectées avec de la saline. Les souris sont euthanasiées au jour 30 suivant la greffe orthotopique. Le volume tumoral a ensuite été mesuré avec la formule suivante :  $\text{volume} = 1/2(\text{longueur} * \text{largeur}^2)$ . Les glandes surrénales sont fixées dans le formol ainsi que le foie, les poumons, le cerveau et le fémur de toutes les souris. Des prélèvements de ces organes sont effectués puis une analyse histologique des coupes après coloration à l'HES est effectué afin de déterminer la présence ou non de métastase.

## 5.5 Immunohistochimie

Afin de voir l'expression de PARP-1 dans les tumeurs primaires de NB, nous avons effectué des expériences d'immunohistochimie. À partir de bloc de paraffine, des sections de 5  $\mu\text{m}$  ont été coupées et marquées à l'hématoxyline, la Phloxine et le Safran (HPS). L'immunohistochimie a été effectuée sur des sections de paraffine à l'aide du kit de détection Ultraview Universal DAB (Ventana, Ventana medical system, Tuscon, AR, É.U.). Un anticorps contre PARP-1 (1/50, monoclonal de souris, ab32138, abcam, Cambridge, MA, É.-U.) a été incubé pour 32 min. Ensuite, le kit de detection Ultraview Universal DAB a été appliqué. DAB a été utilisé comme contremarquage à l'hématoxyline et au chromogène. Un anticorps lapin IgG (1/100) a été utilisé comme contrôle négatif. L'intensité du marquage a été déterminée par une analyse optique semi-quantitative évaluée par un seul observateur ou 0= aucune expression, 1+ = 1 à 25% d'expression, 2+= 26 à 50% d'expression, 3+ 51 à 75% d'expression et 4+ 76% à 100% d'expression de PARP-1.

## 5.6 Viabilité cellulaire

Afin de vérifier l'effet d'AG (fourni par Pfizer Inc., New York, NY, É.-U.) ou de l'Obx (fourni par Gemin X Biotechnologies Inc., Montréal, QC, Canada) utilisé seul ou en combinaison avec le Cis ou la Doxo sur la viabilité cellulaire, des essais MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) ont été faits. Le nombre de cellules a été compté à l'aide d'un hémacymètre afin d'ensemencer  $5 \times 10^3$  cellules par puits dans une plaque 96 puits. Après une incubation de 24 heures à 37°C, les cellules sont incubées à 37°C pendant 24, 48 ou 72 heures avec des concentrations d'Obx (0.05µM, 0.078µM, 0.10µM, 0.15µM, 0.2µM, 0.6µM et 5µM) ou avec une combinaison de ce dernier à 0.5µM ou 0.05µM avec du Cis (0.015µg/mL, 0.15µg/mL, 1.5µg/mL, 7.5µg/mL, 15µg/mL, 75µg/mL et 150µg/mL) pour 24h. Le AG est incubé 24h et été utilisé seul avec les concentrations suivantes : 0.004µM, 0.04µM, 0.2µM, 0.4µM, 2µM, 4µM et 40µM. Aussi, AG a 4µM a été combiné avec du Cis (0.015µg/mL, 0.15µg/mL, 1.5µg/mL, 7.5µg/mL, 15µg/mL, 37.5µg/mL et 75µg/mL) et avec de la Doxo (0.005µM, 0.05µM, 0.5µM, 1.25µM, 2.5µM, 5µM et 50µM). Un volume de 115µL de la solution MTT-SVF 1% (15µL MTT (Promega) + 100µL milieu 1% SVF par puits) est déposé dans chaque puits et est laissé incubé pendant 4 heures à 37°C. Un volume de 100µL de la solution stop (Solubilization Solution/Stop Mix, Promega) est ajouté à chacun des puits suivis d'une incubation de 1h à température pièce et à l'obscurité. La densité optique de chaque puits est mesurée au spectrophotomètre (Spectra Max 190, Molecular Devices) à 570 et 650 nm. La molécule MTT ne peut être clivée que par les mitochondries. Ainsi, seules les cellules vivantes seront quantifiées ce qui nous permet d'effectuer des analyses de survie cellulaire.

## 5.7 Mesure de l'activité enzymatique de PARP-1

Le test Essai Colorimétrique Universel (cat. 4684-096-K, Gaithersburg, MD) a été utilisé pour déterminer l'activité de PARP-1 selon le protocole du manufacturier. Brièvement, des extraits cellulaires ont été préparés à partir de cellules NB10. Les montants suggérés de lysats cellulaires ont été utilisés et ensemencés sur la plaque d'histone suivie par l'ajout du cocktail substrat PARP-1. Ce mélange réactionnel a été incubé à température

pièce pour 30 min. Suite à un lavage avec du PBS 1X + 0.1% Triton X-100 les cellules sont incubées avec un anticorps monoclonal anti-PAR pour 30 min. Après un second lavage de PBS 1X + 0.1% Triton X-100, un anticorps secondaire anti-souris conjuguée à la peroxidase horseradish (IgG-HRP) est incubé pour 30 min. Le substrat colorimétrique TACS-sapphire est ajouté à chaque puits et la réaction est arrêtée avec 0.5M de HCl. La plaque est lue au Spectra Max 190, (Molecular Devices) à 450nm.

## **5.8 Immunofluorescence**

Afin de quantifier les dommages à l'ADN induits par nos traitements, nous avons effectué une technique d'immunofluorescence avec le marqueur de bris doubles brins  $\gamma$ H2aX. Les cellules sont suspendues dans du milieu complet (10% SVF) et ensemencées dans des plaques de 8 puits contenant 10  $\mu$ g/ml de collagène de type-1. Elles sont incubées à 37°C pendant 24h. Suite à leur adhérence les cellules sont traitées avec du AG seul ou en combinaison avec de la Doxo pour 24h. Les cellules sont fixées avec du formaldéhyde 3.7% pour 15 min et incubées 5min avec 20 $\mu$ M de Hoechst (Sigma) pour marquage du noyau. Elles sont perméabilisées avec 0.2% Triton X-100 pour 5min et blockées dans du 1% BSA pour 30 min. Ensuite, les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire anti- $\gamma$ H2aX à 2 $\mu$ g/ml suivi d'une seconde incubation de 30 min avec de la rhodamine conjuguée à un anticorps secondaire anti-souris (Molecular Probes – Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Les puits sont retirés et la lame est recouverte de Immuno-Fluore Mounting Medium (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). La fluorescence a été lue et quantifiée sur le microscope (Zeiss Actio Imager.M1, Allemagne) Le comptage des cellules positives au marquage a été fait à l'aide du logiciel ImageJ 1.46r (National Institutes of Health, É.-U.).

## **5.9 Extraction protéique et Western Blot**

Afin de déterminer quelles voies de signalisation intracellulaire sont modifiées à la suite de nos traitements, nous avons effectué des Western Blot. Pour l'extraction de protéines, les lignées cellulaires (parentales ou sélectionnées) sont centrifugées afin

d'obtenir un culot. Les culots sont ensuite resuspendus dans 500 µl de tampon de lyse (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.5% P-40 Nonidet, 1 mM orthovanadate de sodium, 1 mM fluorure de sodium) et incubés 30 minutes à 4 °C pour obtenir les lysats cellulaires. Les lysats cellulaires des culots sont ensuite analysés après 1h d'incubation avec le réactif Micro BCA™ (Thermo Scientific, Rockford, IL, É.-U) à 60°C. Après, avoir calculé une quantité égale de protéines (20 µg) dans tous les échantillons de lysats cellulaires, les protéines sont solubilisées dans un tampon de Laemmli, le tout apporté à ébullition pendant 5 minutes, séparé par SDS-PAGE, transféré sur des membranes de polyvinylidene difluorure (PVDF) et bloqué 1 heure à la température pièce avec un tampon TBS (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl) contenant 3% d'albumine sérique bovine (BSA). Les membranes sont ensuite incubées avec les anticorps primaires toute la nuit à 4 °C. Une étape de lavage de 15 minutes des membranes de PVDF dans un tampon TBS (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl) contenant 0.1% de Tween 20 est effectuée 4 fois. Les membranes PVDF sont ensuite incubées une heure avec la peroxydase horseradish conjuguée à des anticorps anti-lapin ou anti-souris dilués dans 3% de BSA, ceci suivi d'une seconde étape de lavage de 15 minutes dans un tampon TBS (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl) contenant 0.1% de Tween 20. Les lavages sont répétés un total de 4 fois. Des bandes immunoréactives sont visualisées à l'aide d'un système de détection à l'ECL (PerkinElmer, Waltham, MA, É.-U). Les anticorps primaires utilisés pour cette étude sont dirigé contre AKT1 1/1000 (SC-5298, Santa Cruz), p-AKT 1/1000 (#2965, Cell Signaling), Bcl-2 1/500 (ab692, abcam), β-Actine 1/5000 (ab8227, abcam), Beclin-1 2 µg/mL (ab55878, abcam), anti-γH2AX 4 µg/mL (ab22551, abcam), Caspase-3 clivé 1/1000 (#9664, Cell Signaling), ERK1/2 1/1000 (#4695, Cell Signaling), pERK1/2 1/1000 (#9101, Cell Signaling), PI3K 1/500 (sc-7150, Santa Cruz), PTEN 1/500 (sc-7974, Santa Cruz) et pPTEN 1/500 (sc-31714, Santa Cruz).

### **5.10 Analyse de l'apoptose par Annexin-V**

Le test d'apoptose AnnexinV-FITC (cat. 630109, Clontech Laboratories, Inc.) a été utilisé pour la détection des cellules apoptotiques selon le protocole du manufacturier.

Brièvement, les cellules ont été incubées avec différentes concentrations d'AG (4 $\mu$ M seul ou en combinaison avec 1.5 $\mu$ M, 2.5 $\mu$ M ou 3.5 $\mu$ M de Doxo) et d'Obx (5 $\mu$ M, 0.6 $\mu$ M, 0.2 $\mu$ M, 0.15 $\mu$ M, 0.10 $\mu$ M, 0.078 $\mu$ M, 0.05 $\mu$ M) pour 24 et 48h respectivement. Suite au traitement les cellules ont été lavées avec du PBS1X et trypsinisées. 1 x 10<sup>6</sup> cellules ont été resuspendues dans du tampon de liaison (Binding Buffer) et incubées 10 minutes à la noirceur avec 5  $\mu$ l d'Annexin V-FITC et 5  $\mu$ l de 7-AAD. La fluorescence des cellules a été immédiatement déterminée par cytométrie de flux avec le FACS Calibur<sup>TM</sup> (Becton Dickinson, San Jose, CA, É.U.).

### **5.11 Analyses statistiques**

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées par le test ANOVA-unidirectionnel et bidirectionnel ainsi que le t-test avec le logiciel Graphpad Prism 5 (Graphpad Software inc., É.-U.)  $p < 0.05$  est considéré statistiquement significatif.

# Résultats

## Chapitre 6

### 6.1 Étude d'un inhibiteur de PARP-1, AG, dans le NB

Cette première partie des résultats sera consacrée à l'étude préclinique d'AG dans le NB.

#### 6.1.1 PARP-1 est associée aux tumeurs de bon pronostic.

Afin de déterminer l'expression de PARP-1 dans les tumeurs primaires de NB, nous avons effectué une analyse immunohistochimique. Pour cette étude, nous avons utilisé une cohorte de 132 tumeurs (Figure 7) de patients ayant bénéficié d'un suivi médical d'une durée médiane de 70 mois. Cette cohorte nous a permis d'obtenir des résultats statistiquement robustes. À la fin du suivi, 23% de ces patients étaient décédés. Nous avons déterminé si l'expression de PARP-1 corrélait à trois facteurs pronostiques importants : l'âge, le stade INSS et le statut *MYCN*. Nos résultats démontrent que 79.5% des NB expriment PARP-1 avec une moyenne d'intensité d'expression de 2.13. L'expression de PARP-1 est corrélée aux tumeurs ayant un bon pronostic avec une expression significativement diminuée chez les patients diagnostiqués après l'âge d'un an ( $p=0.04$ ). Cependant, il n'y a pas de corrélation avec la survie du patient à long terme. L'expression de PARP-1 est moins importante dans les NB avec une amplification de *MYCN* que dans ceux qui n'en n'ont pas mais la différence n'est pas significative. L'expression de PARP-1 montre une corrélation avec les différents stades INSS où l'on remarque encore une expression significativement augmentée dans les stades moins agressifs. En effet, dans le stade 2, PARP-1 est significativement plus exprimé que le stade 4 ( $p=0.05$ ) et le stade 3 ( $p=0.008$ ). Cependant, le stade 1 ne montre pas de corrélation significative avec le stade 4 ( $p=0.13$ ) mais une augmentation significative de PARP-1 serait retrouvée en comparant avec le stade 3 ( $p=0.02$ ). Aucune différence significative n'a été trouvée entre les stades 3 et 4s ( $p=0.1$ ) et 4 et 4s ( $p=0.39$ ). De plus, les stades 1 et 2 exprimeraient des niveaux plus élevés que les stades 3 et 4 ( $p=0.008$ ). Nous observons aussi une augmentation significative

de PARP-1 dans les tumeurs par rapport au contrôle mais aucune corrélation n'existe entre l'expression de PARP-1 dans tumeurs et les métastases.

A

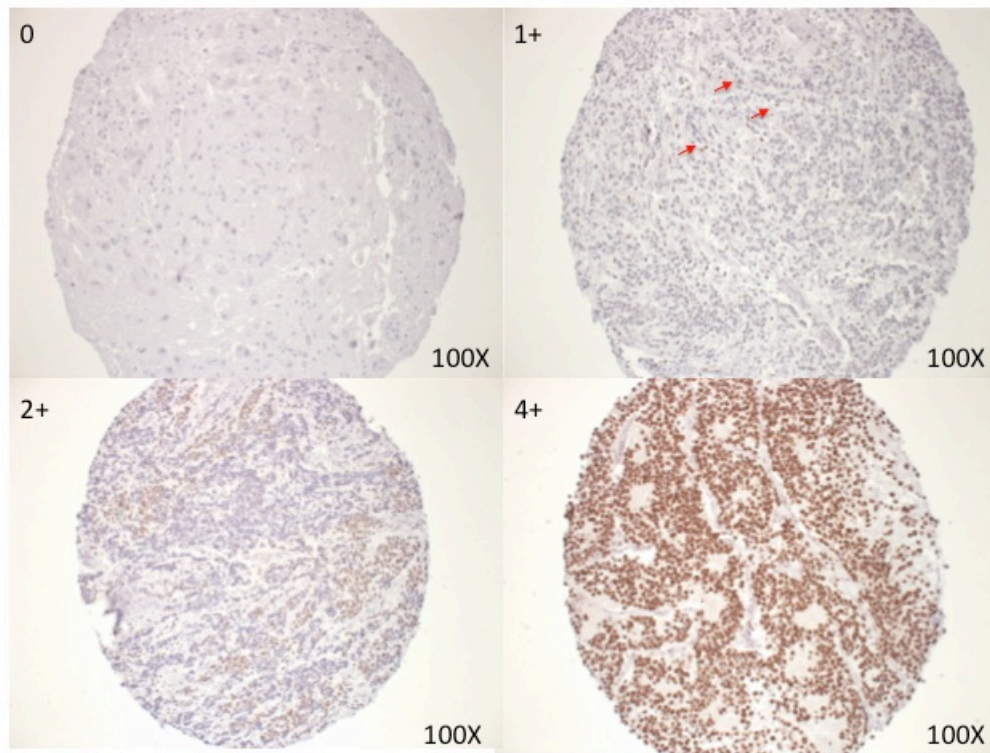
Variable	Patients Totaux No (%)	PARP			
		No	%	Int	p
<b>Patients Totaux</b>	132	105	79.5	2.13	
<b>Suivis</b>					
Médiane (écart), en mois	70(1- 218)				
Vivants	102 (77)	77	75	2.18	
Décédés	30 (23)	28	93	1.84	ns
<b>Âge</b>					
Médiane (écart), en mois	31(0- 183)				
< 365 jours	48 (36)	37	77	2.42	
≥ 365 jours	84 (64)	68	81	1.93	0.04
<b>Stade</b>					
1	35 (27)	28	80	2.28	
2	25 (18)	18	72	2.50	0.05 <sup>1</sup>
3	13 (10)	11	84	1.42	0.02 <sup>2</sup>
4	49(37)	40	81	1.85	ns <sup>3</sup>
4S	10 (8)	8	80	2.25	ns <sup>4</sup>
<b>Statut MYCN</b>					
Amplifié	14 (10)	12	85	1.83	
Non Amplifié	88 (67)	74	84	2.28	ns
Pas connu	30 (23)				
<b>Type d'échantillon</b>					
Tumeurs	132	105	79.5	2.13	
Métastases	33	28	84	2.11	ns
contrôle	27	17	62	0.25	<0.01

<sup>1</sup> : stade 2 versus 4

<sup>2</sup> : stade 1 versus 3

<sup>3</sup> : stade 1 versus 4

<sup>4</sup> : stade 4 versus 4s

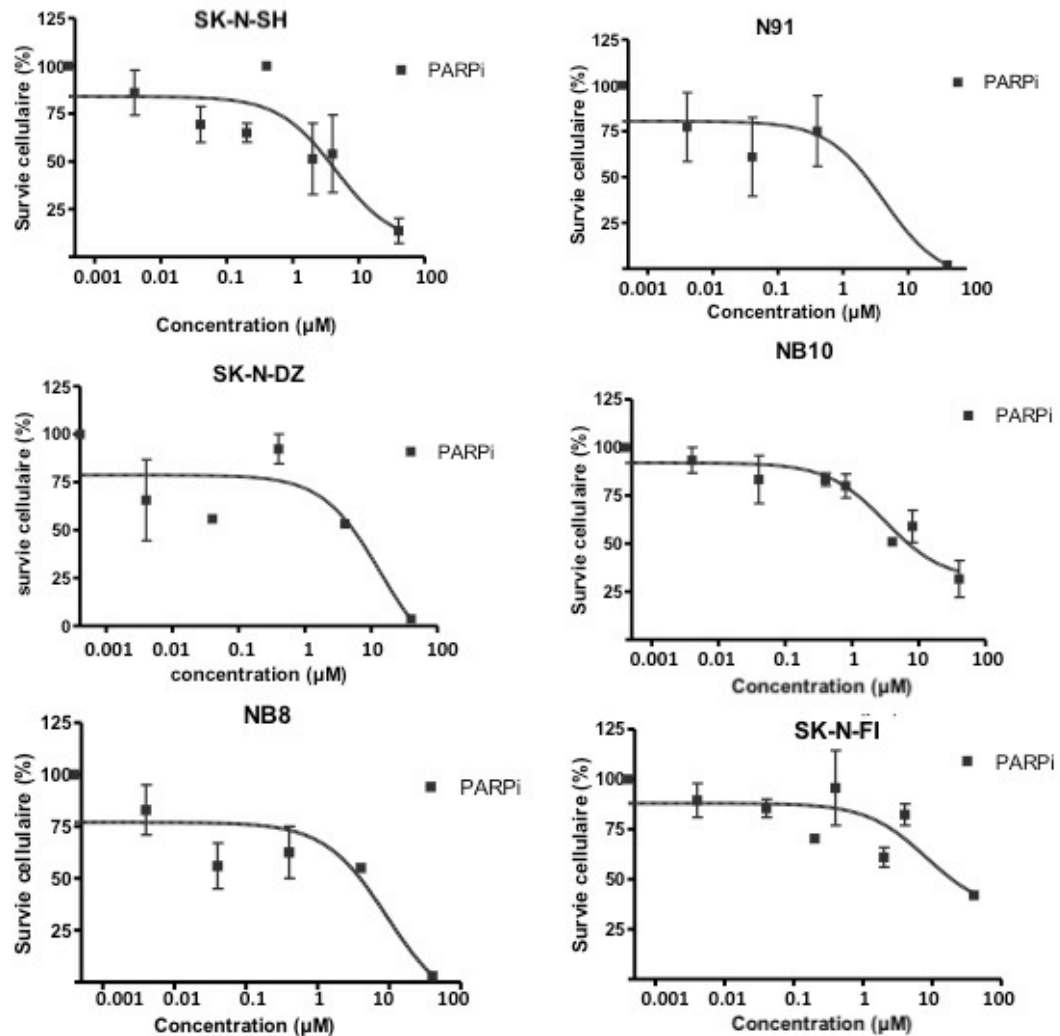
**B**

**Figure 7 : L'expression nucléaire de PARP-1 est associée aux tumeurs de bon pronostic.** Les scores d'immunomarquage ont été établis par une analyse optique semi-quantitative d'échantillons contenant plus de 100 neuroblastes. Le pourcentage de cellules positives dans chaque échantillon a été évalué comme suit : 0 = toutes les cellules sont négatives, 1+ = 1 à 25% de cellules positives, 2+ = 26 à 50% de cellules positives, 3+ = 51 à 75% de cellules positives et 4+ = plus de 76% de cellules positives. Les surrénales et les ganglions sympathiques de chaque patient ont été utilisés comme contrôles. Les analyses statistiques ont été faites avec le test-t statistique (logiciel Graphpad Prism). **(A)** Tableau regroupant les paramètres analysés. **No** : nombre, **Int** : intensité, **p** : valeur de p, **ns** : non significatif. **(B)** Exemple de tumeurs représentatives de chaque groupe (Grossissement 100x).



### **6.1.2 Effet d'AG en monothérapie sur les cellules de NB**

Puisque les tumeurs primaires de NB démontrent une forte expression de PARP-1 nous avons voulu déterminer l'efficacité du PARPi en monothérapie. Pour ce faire, nous avons effectué un test MTT pour évaluer la survie cellulaire de 6 lignées de NB. Ainsi, nous avons incubé les cellules avec les concentrations d'AG suivantes : 0.004 $\mu$ M, 0.04 $\mu$ M, 0.2 $\mu$ M, 0.4 $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 4 $\mu$ M et 40 $\mu$ M. Les résultats de ces courbes de survie et les tableaux récapitulatifs des IC50 sont retrouvés à la figure 8. On observe une grande hétérogénéité cellulaire dans la réponse au traitement. Les SK-N-DZ, SK-N-FI et NB8 démontrent la plus grande résistance avec des IC50 respectifs suivants : 13.6 $\mu$ M, 9.24 $\mu$ M et 8.22 $\mu$ M. Les NB10, N91, et SK-N-SH semblent être les plus sensibles avec des IC50 respectifs suivants : 3.128 $\mu$ M, 4.19 $\mu$ M et 4.49 $\mu$ M.



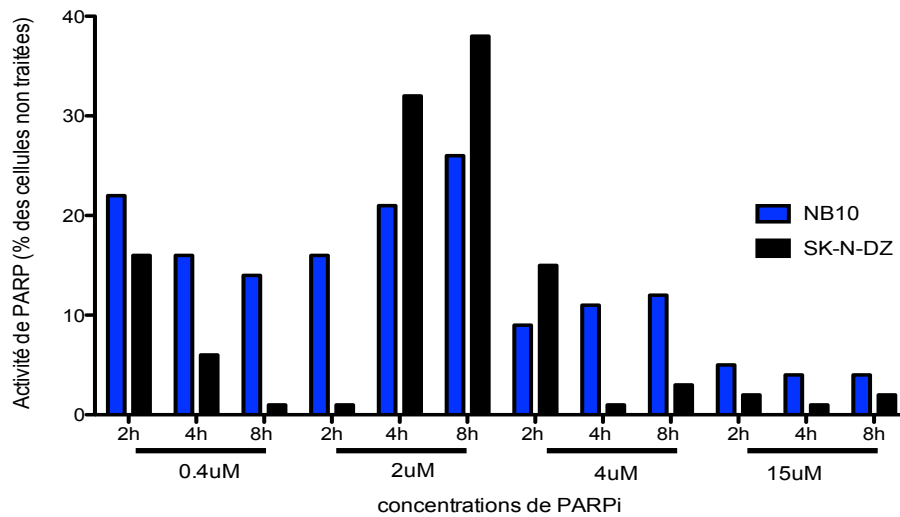
Lignées Cellulaires	IC 50 (µM)
SK-N-SH	4.49
N91	4.19
SK-N-DZ	13.6
NB10	3.128
NB8	9.24
SK-N-FI	8.22

**Figure 8 : Traitements avec AG en monothérapie.** Les cellules des 6 lignées de NB sont traitées pendant 24 heures avec 7 concentrations différentes de PARPi à des concentrations variant entre 0.004 et 40µM (valeurs moyennes ± erreur-type, n=3 expériences)

indépendantes). Les médicaments sont dilués en solution dans du milieu DMEM + 1% SVF.

### **6.1.3 AG inhibe l'activité enzymatique de PARP-1**

Pour optimiser la concentration du PARPi à utiliser lors de combinaison avec d'autres agents anticancéreux nous avons effectué un test Essai Colorimétrique Universel qui mesurait l'activité enzymatique de PARP-1 en présence d'AG. Pour ce faire, nous avons incubé les cellules NB10 et SK-N-DZ à différentes concentrations d'inhibiteur de PARP-1 soit 0.4 $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 4 $\mu$ M et 15 $\mu$ M. On observe une baisse de l'activité de PARP-1 aussitôt que 2 heures suivant l'incubation de 0.4 $\mu$ M AG (figure 9). On remarque que les cellules NB10 sont moins sensibles au PARPi et auraient une plus grande activité enzymatique que les SK-N-DZ pour une même concentration. On remarque que généralement l'inhibition de l'enzyme est corrélée à la concentration d'inhibiteur avec la plus forte inhibition de PARP-1 retrouvée à 15 $\mu$ M. De plus, pour une concentration donnée, l'inhibition enzymatique ne semble ni diminuer ni augmenter significativement avec le temps. Par contre, on remarque que 2 $\mu$ M de PARPi semble être moins efficace dans les NB10 et SK-N-DZ. À la lumière de ces résultats, et puisque la IC50 de chaque lignée est élevée (figure 8), nous avons décidé de poursuivre le reste des expériences de thérapies combinées avec 4 $\mu$ M de PARPi.

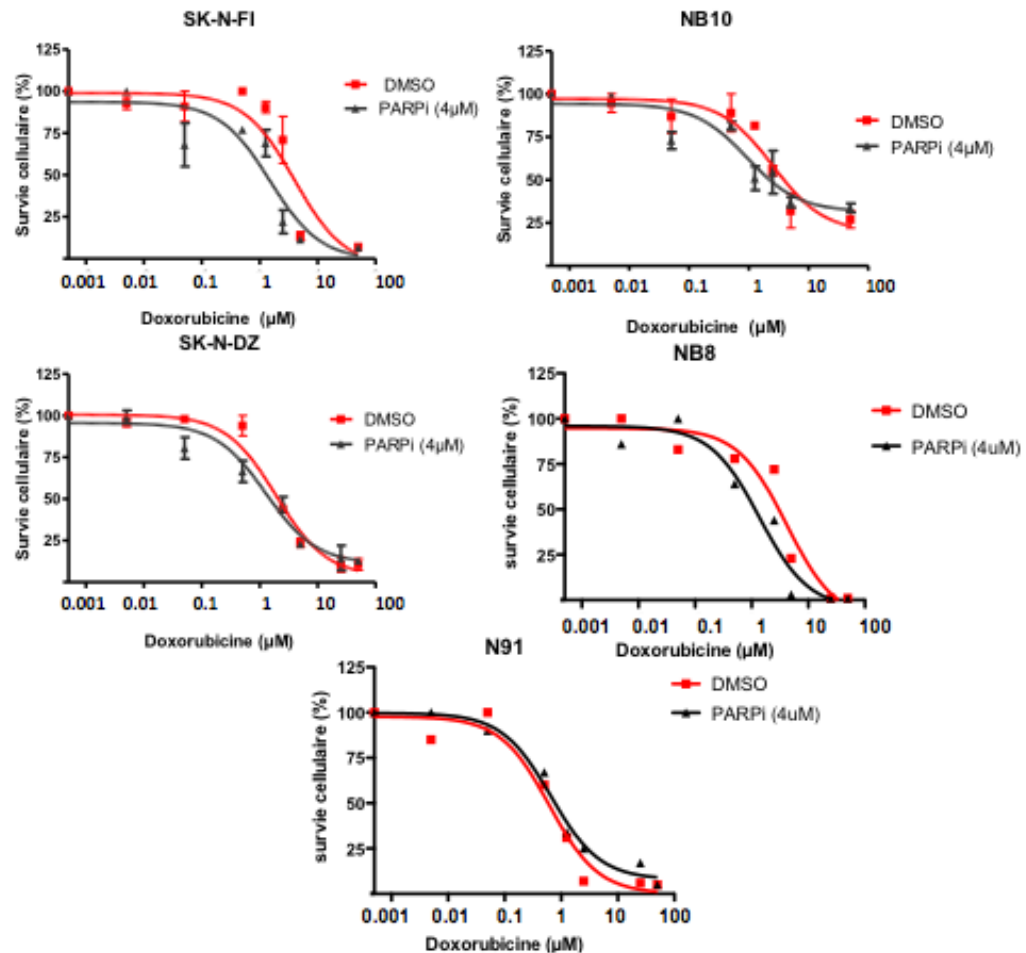


**Figure 9 : Activité enzymatique de PARP-1.** Les cellules NB10 et SK-N-DZ ont été traitées avec les concentrations d'AG suivantes : 0.4μM, 2μM, 4μM et 15μM. Un test Essai Colorimétrique Universel a été utilisé afin de déterminer l'activité enzymatique de PARP-1 à la suite des traitements et pour une durée maximale de 8h. Le PARPi est dilué en solution dans du milieu DMEM + 1% SVF.

#### 6.1.4 Traitement d'AG en combinaison avec la Doxo.

La Doxo est un agent anticancéreux couramment utilisé dans le traitement du NB et, puisque c'est un agent génotoxique, nous avons utilisé ce médicament comme premier partenaire pour les traitements combinés avec PARPi. Pour ce faire, nous avons effectué, à l'aide de test MTT, des courbes de survie cellulaire. Nous avons incubé 5 de nos lignées cellulaires avec les concentrations de Doxo suivantes : 0.005μM, 0.05μM, 0.5μM, 1.25μM, 2.5μM, 5μM et 50μM. À chacune de ces concentrations s'ajoute 4μM d'AG. Les résultats sont compilés à la figure 10 et illustrent, pour les lignées SK-N-FI, SK-N-DZ et NB10, 3 essais de viabilité cellulaire chacun, alors qu'un seul essai de survie cellulaire a été effectué sur les NB8 et N91. Nos résultats démontrent que pour les NB10, les SK-N-DZ et les SK-N-FI la thérapie combinée n'a aucun effet significatif sur la viabilité cellulaire avec les test-t statistique respectif égal à  $p=0.7414$  et  $p=0.8336$  et  $p=0.4775$ . Bien que non significative, nous observons une légère diminution de la survie cellulaire et, pour

confirmer ces données, nous envisageons de compléter notre analyse. Bien qu'aucune statistique ne puisse encore être faite sur les NB8 et N91, on observe une tendance similaire aux NB10 et SK-N-DZ et la survie cellulaire ne semble pas être significativement réduite.



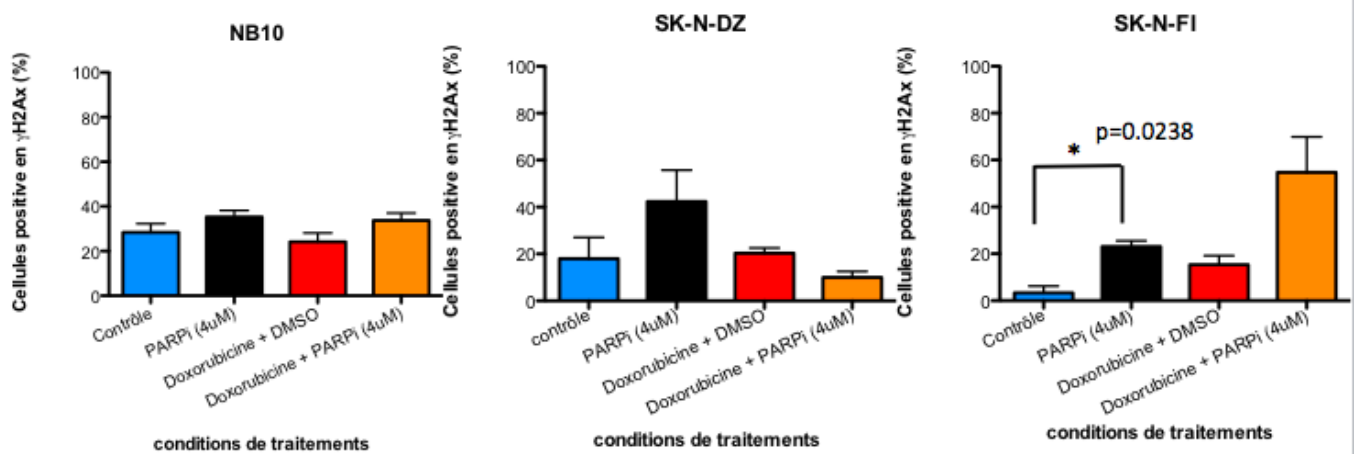
**Figure 10 : Traitements d'AG en combinaison avec la Doxo.** Les cellules des 5 lignées de NB sont traitées pendant 24 heures avec 7 concentrations différentes de Doxo variant de 0.005 à 50µg/mL en combinaison avec une concentration fixe de PARPi à 4µM (valeurs moyennes ± erreur-type, n=3 expériences indépendantes). Les médicaments sont dilués en solution dans du milieu DMEM + 1% SVF. Les analyses statistiques ont été faites avec le test-t (logiciel Graphpad Prism).

### **6.1.5 Effet des traitements d'AG seul ou en combinaison avec la Doxo sur les DSB d'ADN.**

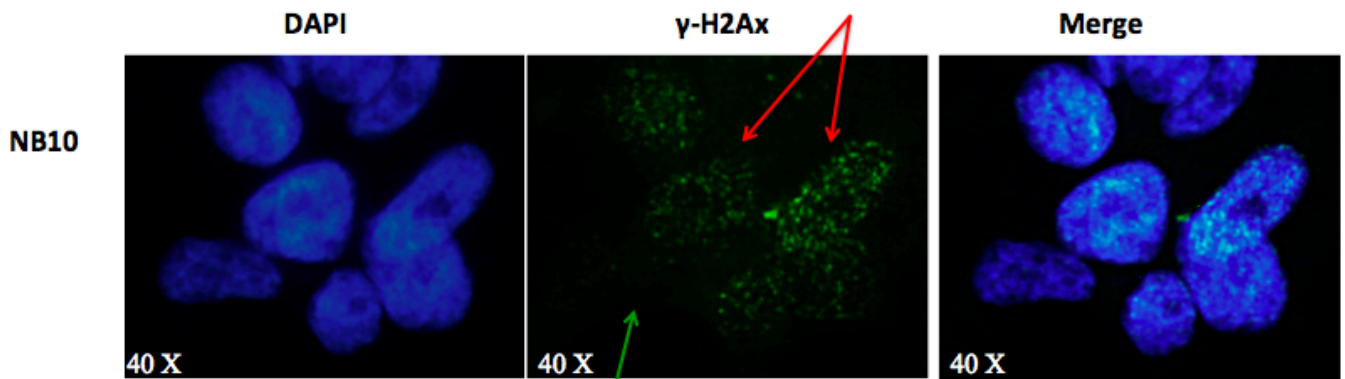
Puisque la combinaison d'AG avec un autre agent génotoxique devrait augmenter les dommages doubles brins d'ADN, nous avons utilisé un marqueur de ces DSB, le  $\gamma$ H2Ax, en immunofluorescence. Pour ce faire nous avons incubé les lignées SK-N-DZ, SK-N-FI et NB10 avec leurs concentrations IC50 de Doxo respectives soit 1.5 $\mu$ M, 3.5 $\mu$ M et 2.5 $\mu$ M, seul ou en combinaison avec PARPi à 4 $\mu$ M. Nous avons aussi incubé les cellules avec une concentration de PARPi à 4 $\mu$ M afin de déterminer si AG induisait à lui seul des dommages à l'ADN. Nous avons quantifié les cellules positives au marqueur  $\gamma$ H2Ax dont les résultats se trouvent à la figure 11A. À la figure 11B, une image caractéristique illustre les cellules positives au marqueur (flèche rouge) et les cellules qui n'expriment pas de lésion (flèche verte). Nos résultats ne démontrent aucun effet marqué sur les cellules SK-N-DZ et NB10 confirmé par le test-t statistique. Par contre, les SK-N-FI montrent une augmentation significative de DSB pour le PARPi seul versus le contrôle ( $p=0.0238$ ). De plus, nous observons une augmentation des DSB lorsque PARPi est ajouté à la Doxo versus la Doxo seule malgré que cette augmentation n'est pas statistiquement significative ( $p=0.0661$ ). Nous avons ensuite effectué des Western Blot afin de déterminer le niveau d'expression protéique de  $\gamma$ H2Ax (figure 11C). Les trois lignées cellulaires ont des variations d'expression de  $\gamma$ H2Ax qui ne semblent pas corrélérer au résultat d'immunofluorescence. Dans les SK-N-DZ, il semble y avoir une forte augmentation de  $\gamma$ H2Ax dans les puits traités avec Doxo, sans modulation de celle-ci suite à l'ajout du PARPi. Dans les NB10, on retrouve une expression constante de  $\gamma$ H2Ax dans chaque condition excepté le contrôle, ce qui n'est pas retrouvé dans les résultats d'immunofluorescence. Pour les SK-N-FI, on observe une expression protéique qui semble inverse aux résultats d'immunofluorescence avec une diminution de l'expression de  $\gamma$ H2Ax dans les cellules traités au PARPi versus le contrôle. Plusieurs études ont déconseillé l'utilisation des Western Blot dans la quantification de  $\gamma$ H2Ax. Puisque  $\gamma$ H2Ax formé sur les DSB est un pourcentage du H2Ax total de la cellule, le niveau absolu de  $\gamma$ H2Ax peut

varier beaucoup entre différentes lignées cellulaires et ce malgré le même nombre de DSB<sup>150</sup>. De plus, les DSB qui surviennent lors de l'apoptose sont eux-mêmes suffisants pour initier la formation de  $\gamma$ H2Ax et altérer les niveaux totaux de la protéine<sup>150</sup>.

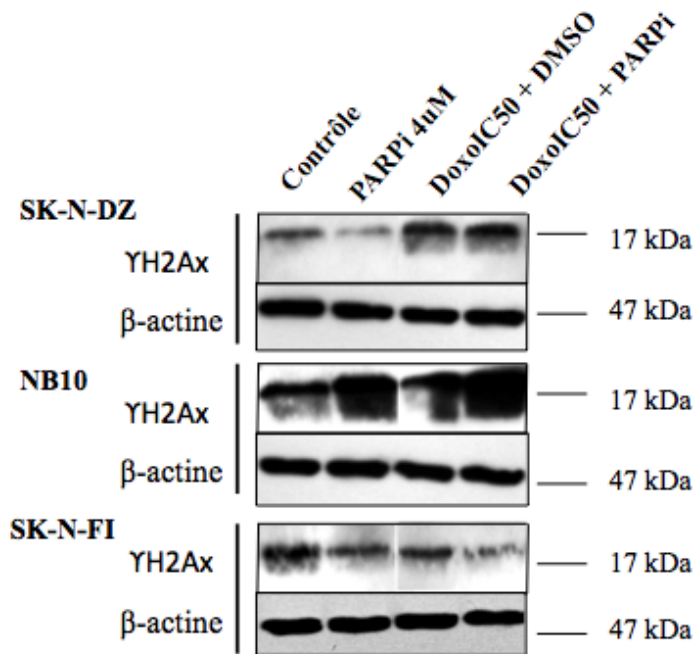
A



B



C



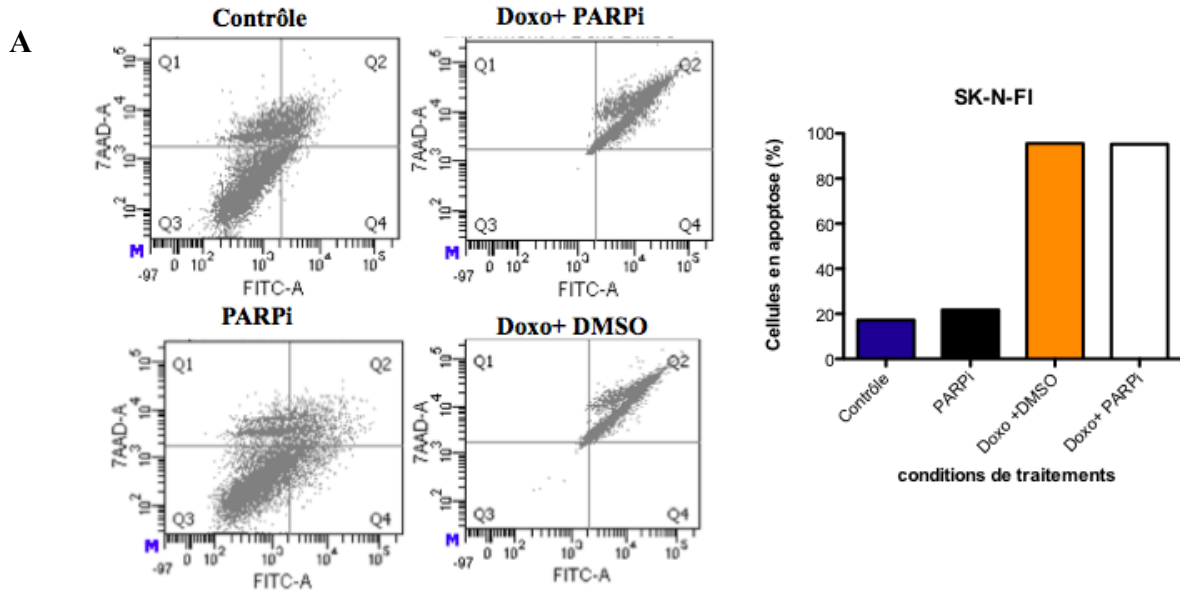
**Figure 11 : Effet des traitements d'AG seul ou en combinaison avec la Doxo sur les bris double brins d'ADN.** Les cellules des 3 lignées sont traitées pendant 24 heures avec de la Doxo à l'IC50 respectif des cellules (SK-N-FI : 3.5μM NB10 : 2.5μM SK-N-DZ : 1.5μM) en combinaison ou non, avec 4μM de PARPi. Les cellules sont aussi traitées avec de l'AG à 4μM ou au DMSO. Les médicaments sont dilués en solution dans du milieu DMEM + 1% SVF. (A) Afin de quantifier les cellules ayant des bris doubles brins par immunofluorescence, les cellules sont incubées avec un anticorps γH2Ax (valeurs moyennes de 4 réplicats par condition ± écart-type, n=1 expérience). (B) Le comptage des cellules positives au marquage a été fait à l'aide du logiciel ImageJ 1.46r. Les cellules positives au marquage γH2Ax sont représentées par les flèches rouges (Grossissement 40X). La flèche verte représente les cellules négatives (Grossissement 40X) (C) Les niveaux d'expressions de γH2Ax et B-actine ont été déterminés par Western Blot. Les analyses statistiques ont été faites avec le test-t (logiciel Graphpad Prism).

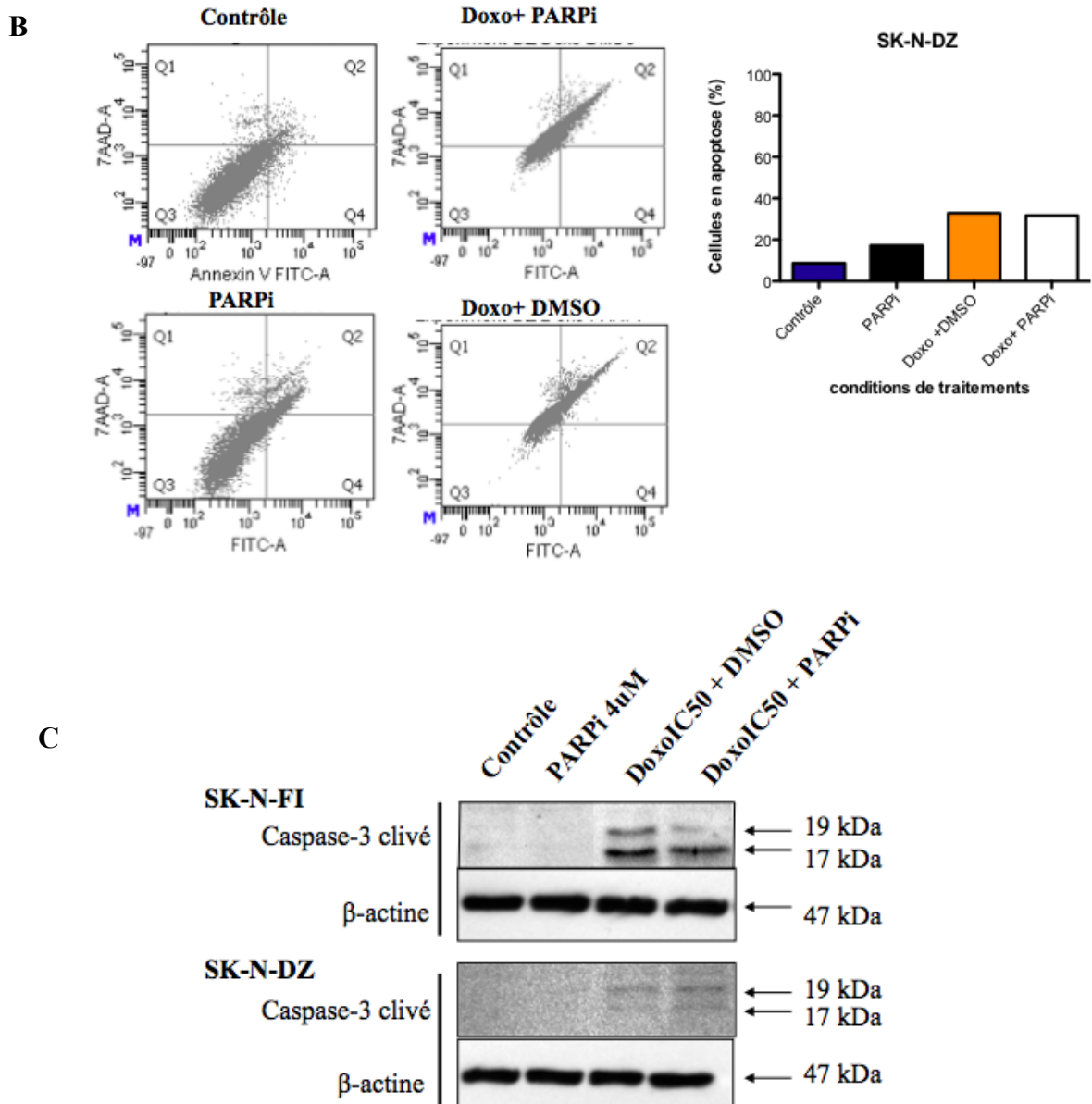
### 6.1.6 Analyse de l'apoptose après traitement par AG

Afin de caractériser les effets d'AG sur la mort cellulaire par apoptose nous avons effectué un test d'Annexin V sur nos lignées cellulaires SK-N-FI (figure 12A) et SK-N-DZ (figure 12B). Pour ce faire nous avons traité nos cellules avec les IC50 de Doxo respectif de chaque lignée soit 3.5μM et 1.5μM respectivement, seul ou en combinaison avec 4μM de



PARPi. Les effets du PARPi en monothérapie à 4 $\mu$ M ont aussi été déterminés. Nous observons, pour les deux lignées cellulaires, une très petite augmentation de cellules en apoptose lorsque celles-ci sont traitées avec 4 $\mu$ M de PARPi. Nous allons explorer d'avantage ce léger accroissement d'apoptose en renouvelant nos expériences. On remarque une augmentation marquée de cellules apoptotiques lorsque les SK-N-FI et SK-N-DZ sont incubées avec la Doxo. L'association Doxo avec AG n'augmente pas le pourcentage de mort. Afin de confirmer ces résultats, nous avons regardé par Western Blot l'expression protéique de la Caspase-3 clivé. Aucune activation de Caspase-3 n'est détectée dans les conditions de traitement de PARPi en monothérapie. Cependant, on détecte la présence de Caspase-3 clivé lorsque les cellules sont traitées à la Doxo. Toutefois, cette expression n'est pas modulée par l'ajout du PARPi dans les SK-N-FI mais il semble y avoir une légère augmentation de Caspase-3 clivé dans les SK-N-DZ.



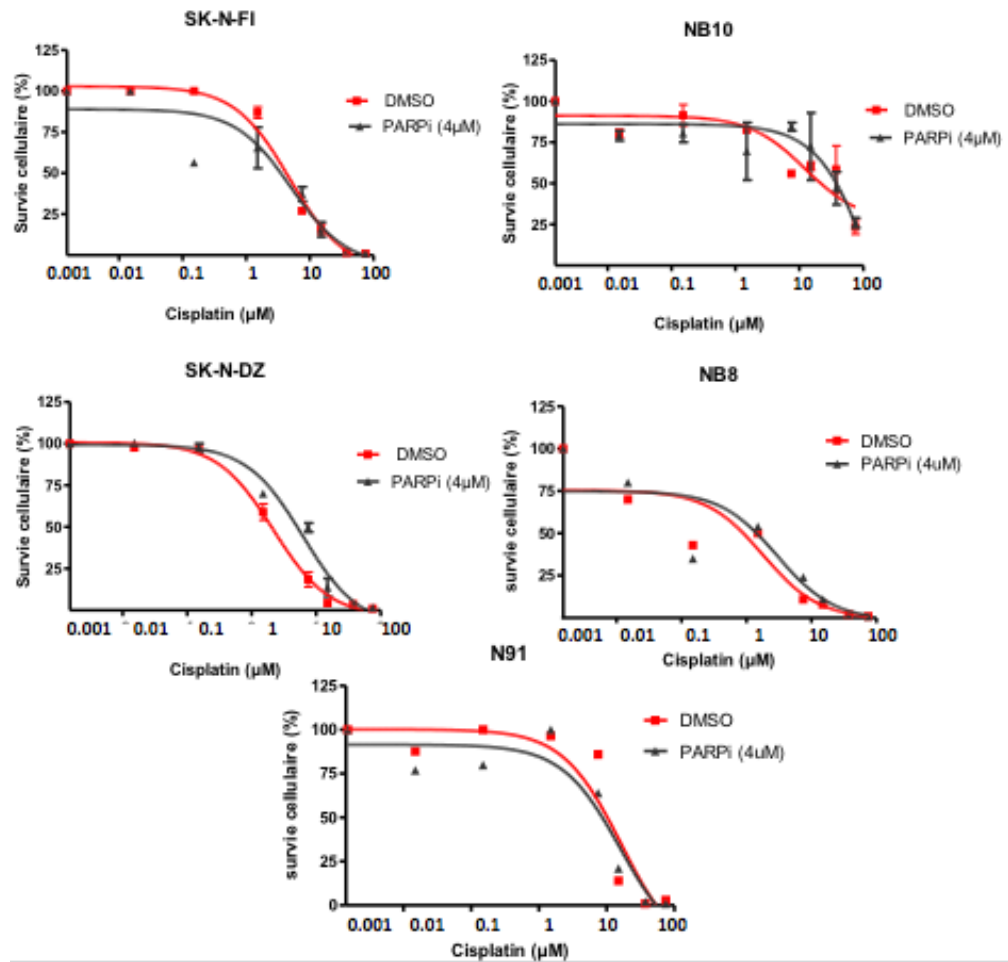


**Figure 12 : L'AG n'induit pas la mort cellulaire par apoptose :** Les cellules des 2 lignées sont traitées pendant 24h heures avec de la Doxo à l'IC50 respectif des cellules (**SK-N-FI** : 3.5μM et **SK-N-DZ** : 1.5μM) en combinaison ou non, avec 4μM de PARPi. Les cellules sont aussi traitées avec de l'AG à 4μM ou au DMSO. Les médicaments sont dilués en solution dans du milieu DMEM + 1% SVF. **(A)** Les cellules SK-N-FI sont marquées à l'Annexin-V et au 7-AAD et la fluorescence est analysée par cytométrie de flux. L'histogramme quantitatif représente la somme des cellules en Q2 et Q4 **(B)** Les

cellules SK-N-DZ sont marquées à l'Annexin-V et au 7-AAD et la fluorescence est analysée par cytométrie de flux. L'histogramme quantitatif représente la somme des cellules en Q2 et Q4 (C) Les niveaux d'expression de Caspase-3 clivé et B-actine ont été déterminés par Western Blot. **Q1** : nécrose **Q2** : apoptose tardive **Q3** : cellules vivantes **Q4** : apoptose précoce

### 6.1.7 Traitements d'AG en combinaison avec le Cis.

Le Cis, un deuxième agent génotoxique classiquement utilisé dans le traitement du NB, a été le deuxième partenaire de choix à explorer pour une thérapie combinée avec AG. Ainsi, nous avons effectué des tests MTT sur 5 lignées cellulaires à l'aide des concentrations de Cis suivantes : 0.015µg/mL, 0.15µg/mL, 1.5µg/mL, 7.5µg/mL, 15µg/mL, 37.5µg/mL et 75µg/mL en combinaison avec 4µM d'AG. Les courbes de survie cellulaire sont illustrées à la figure 13. Les traitements pour les SK-N-FI, SK-N-DZ et NB10 ont été effectués 3 fois alors que les cellules N91 et NB8 ont été traitées qu'une fois. Nos résultats démontrent que pour les NB10, SK-N-DZ et SK-N-FI la thérapie combinée n'a aucun effet significatif sur la viabilité cellulaire avec les test-t statistique respectif égal à  $p=0.9508$ ,  $p=0.7639$  et  $p=0.7619$ . Bien qu'aucune statistique ne puisse encore être faite sur les NB8 et N91, on observe une tendance similaire aux 3 autres lignées et la survie cellulaire ne semble pas être significativement réduite.



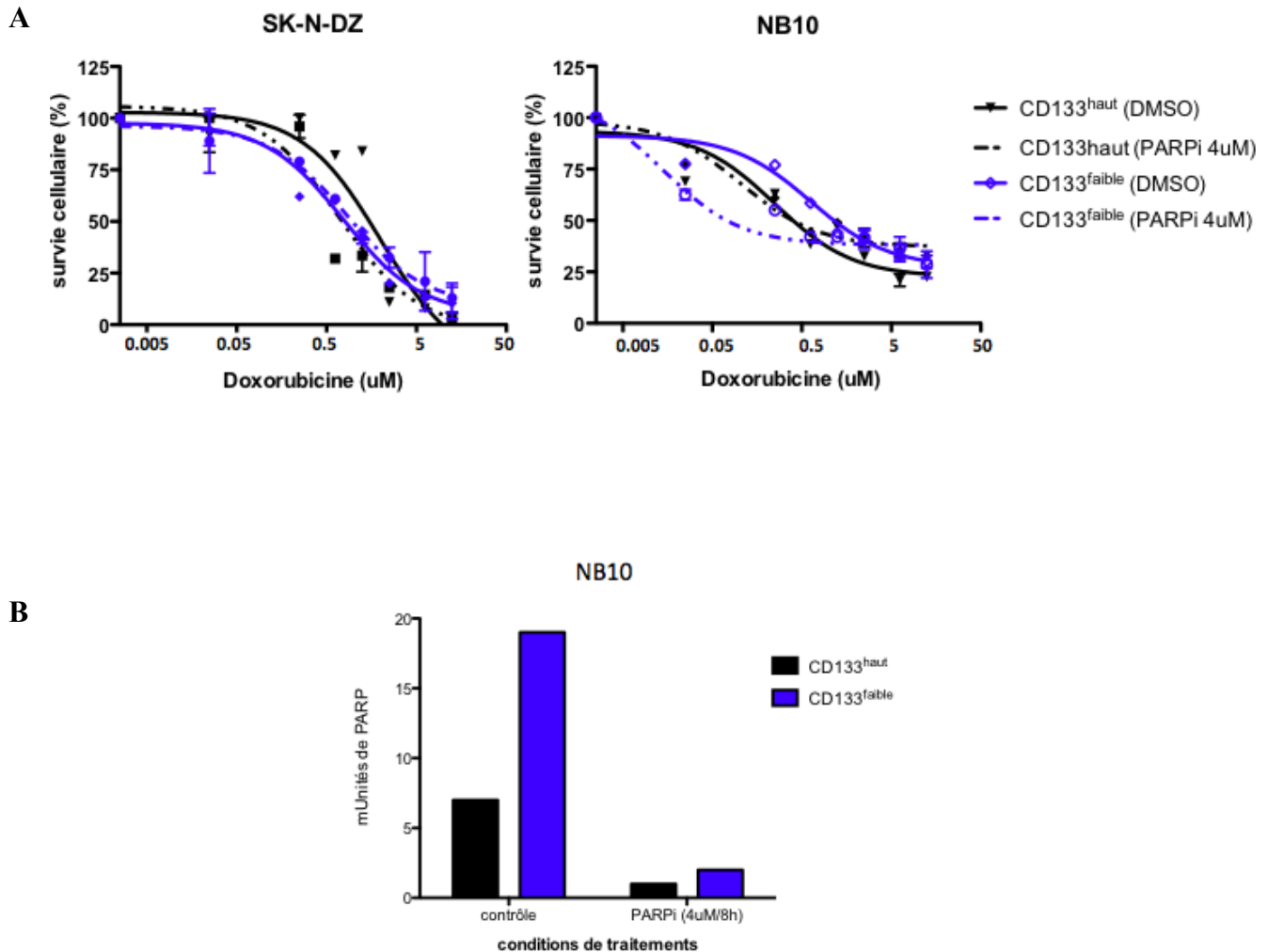
**Figure 13 : Traitements d'AG en combinaison avec le Cis.** Les cellules des 5 lignées de NB sont traitées pendant 24 heures avec 7 concentrations différentes de Cis variant de 0.015 à 75 μg/mL en combinaison avec une concentration fixe de PARPi à 4 μM (valeurs moyennes ± erreur-type, n=3 expériences indépendantes). Les médicaments sont dilués en solution dans du milieu DMEM + 1% SVF. Les analyses statistiques ont été faites avec le test-t (logiciel Graphpad Prism).

### 6.1.8 Effet des traitements combinés d'AG et de Doxo sur les CSC

Nous avons ensuite déterminé si la combinaison Doxo et AG a un effet sur la survie cellulaire des CSC du NB (Figure 14A). Pour ce faire, nous avons trié les cellules NB10 et SK-N-DZ par cytométrie de flux à l'aide d'un anticorps CD133. Afin de déterminer les

courbes de survie, nous avons effectué des tests MTT avec les populations cellulaires CD133<sup>haut</sup> et CD133<sup>bas</sup> traitées avec les concentrations de Doxo suivantes : 0.05µM, 0.5µM, 1.25µM, 2.50µM, 5µM, 12.5µM et 25µM en combinaison avec 4µM de PARPi. Nos résultats démontrent que cette thérapie combinée ne diminue pas de manière significative la survie des CSC. En effet, pour les deux lignées cellulaires on ne retrouve aucune différence de viabilité entre les CSC et le reste des cellules tumorales confirmée par le test statistique ANOVA- bidirectionnel (p=0.2191 pour les NB10 et p=0.6933 pour les SK-N-DZ). Cependant, il est intéressant de noter que la courbe de survie des cellules SK-N-DZ CD133<sup>haut</sup> traitées avec Doxo et AG semble se superposer à celles des cellules non-souches CD133<sup>faible</sup> traitées à la Doxo seule, et malgré un résultat non-significatif, AG pourrait contribuer à diminuer la survie cellulaire des CSC.

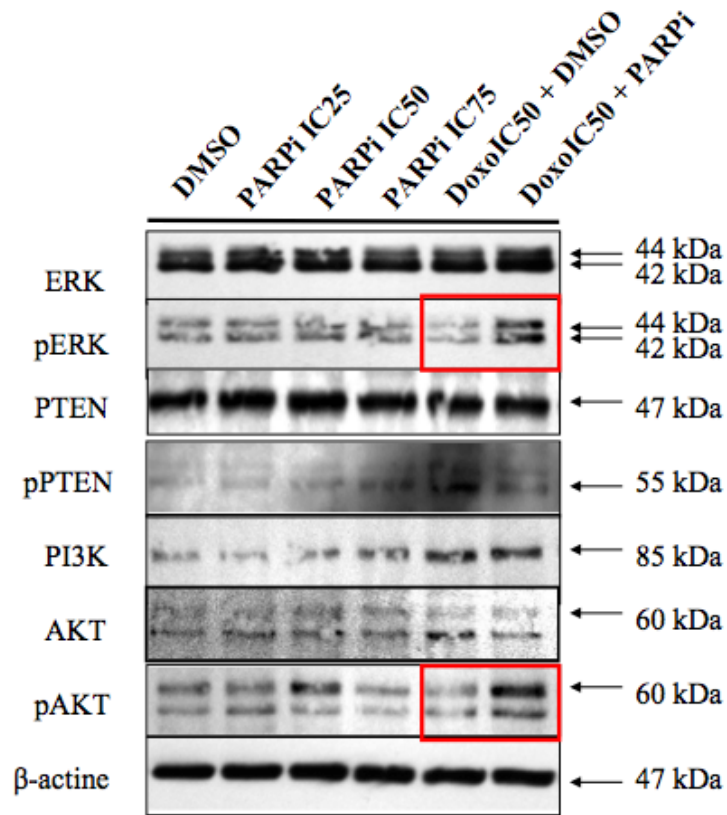
Nous avons ensuite voulu déterminer les niveaux de base d'activité enzymatique de PARP-1 dans les CSC versus le reste des cellules tumorales (figure 14B). Pour ce faire, nous avons effectué un test Essai Colorimétrique Universel. Nous observons que les cellules souches CD133<sup>haut</sup> expriment un niveau d'activité enzymatique de PARP-1 beaucoup moins important que le reste des cellules (CD133<sup>bas</sup>). Une incubation de 8 heures avec 4µM d'AG montre une inhibition de l'activité enzymatique de PARP-1 marquée dans les deux populations mais légèrement plus importante dans les cellules CD133<sup>haut</sup>.



**Figure 14 : Effet des traitements combinés d'AG et de Doxo sur les CSC.** Les cellules des deux lignées de NB ont été triées par cytométrie de flux à l'aide d'un anticorps CD133. **(A)** Ensuite, elles sont traitées pendant 24 heures avec 7 concentrations différentes de Doxo variant de 0.05 à 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en combinaison avec une concentration fixe de PARPi à 4 $\mu\text{M}$  (valeurs moyennes  $\pm$  erreur-type, n=3 expériences indépendantes). Les médicaments sont dilués en solution dans du milieu DMEM + 1% SVF. **(B)** Un test Essai Colorimétrique Universel a été effectué sur les cellules triées. Les cellules ont été traitées avec 4 $\mu\text{M}$  de PARPi pendant 8 heures. Les analyses statistiques ont été faites avec le test ANOVA-bidirectionnel (logiciel Graphpad Prism).

### **6.1.9 Modulation de la voie PI3K/AKT et MAPK lorsque AG est combiné à la Doxo**

Des études ont démontré que l'inhibition de PARP-1 activait la voie de signalisation PI3K/AKT ainsi que la voie MAPK<sup>151,152</sup>. Afin de déterminer si ces voies de signalisation intracellulaire sont modulées à la suite de notre traitement d'AG en monothérapie ou en combinaison avec Doxo nous avons effectué des extractions protéiques de plusieurs échantillons de SK-N-DZ et nous avons détecté, par Western Blot, l'expression de plusieurs protéines. Les cellules ont été traitées à l'IC25, l'IC50 et l'IC75 d'AG soit 3 $\mu$ M, 15 $\mu$ M et 30 $\mu$ M respectivement. De plus, nous avons traité les cellules à l'IC50 de Doxo, soit 1.5 $\mu$ M, en présence, ou non, de 4 $\mu$ M de PARPi. Les résultats sont retrouvés à la figure 15. Les concentrations croissantes de PARPi ne semblent pas moduler la voie de signalisation MAPK, mais sa combinaison avec Doxo augmente l'expression de pERK. L'expression protéique du suppresseur de tumeur PTEN, et sa forme inactivée pPTEN, restent constantes dans chacune des conditions. Pour ce qui est de la voie de signalisation PI3K/AKT, aucune modulation n'est observée pour PI3K, mais la combinaison Doxo et PARPi augmente l'expression de pAKT.



**Figure 15 : Effet des traitements de PARPi seul ou en combinaison avec la Doxo sur la modulation des voies de signalisation.** DMSO: Milieu DMEM + 1% SVF + DMSO, PARPi IC25: 3 $\mu$ M, PARPi IC50: 14 $\mu$ M, PARPi IC75: 30 $\mu$ M, DoxoIC50 + DMSO: Doxo 1.5 $\mu$ M + DMSO, DoxoIC50 + PARPi : Doxo 1.5 $\mu$ M + PARPi 4 $\mu$ M. Les niveaux d'expression de ERK, pERK, PTEN, pPTEN, PI3K, AKT, pAKT et  $\beta$ -actine ont été déterminés par Western Blot sur la lignée SK-N-DZ. Les membranes sont incubées avec les anticorps primaires toute la nuit à 4 °C. Elles sont ensuite incubées une heure avec la peroxydase horseradish conjuguée à des anticorps anti-lapin ou anti-souris et des bandes immunoréactives sont visualisées à l'aide d'un système de détection à l'ECL.

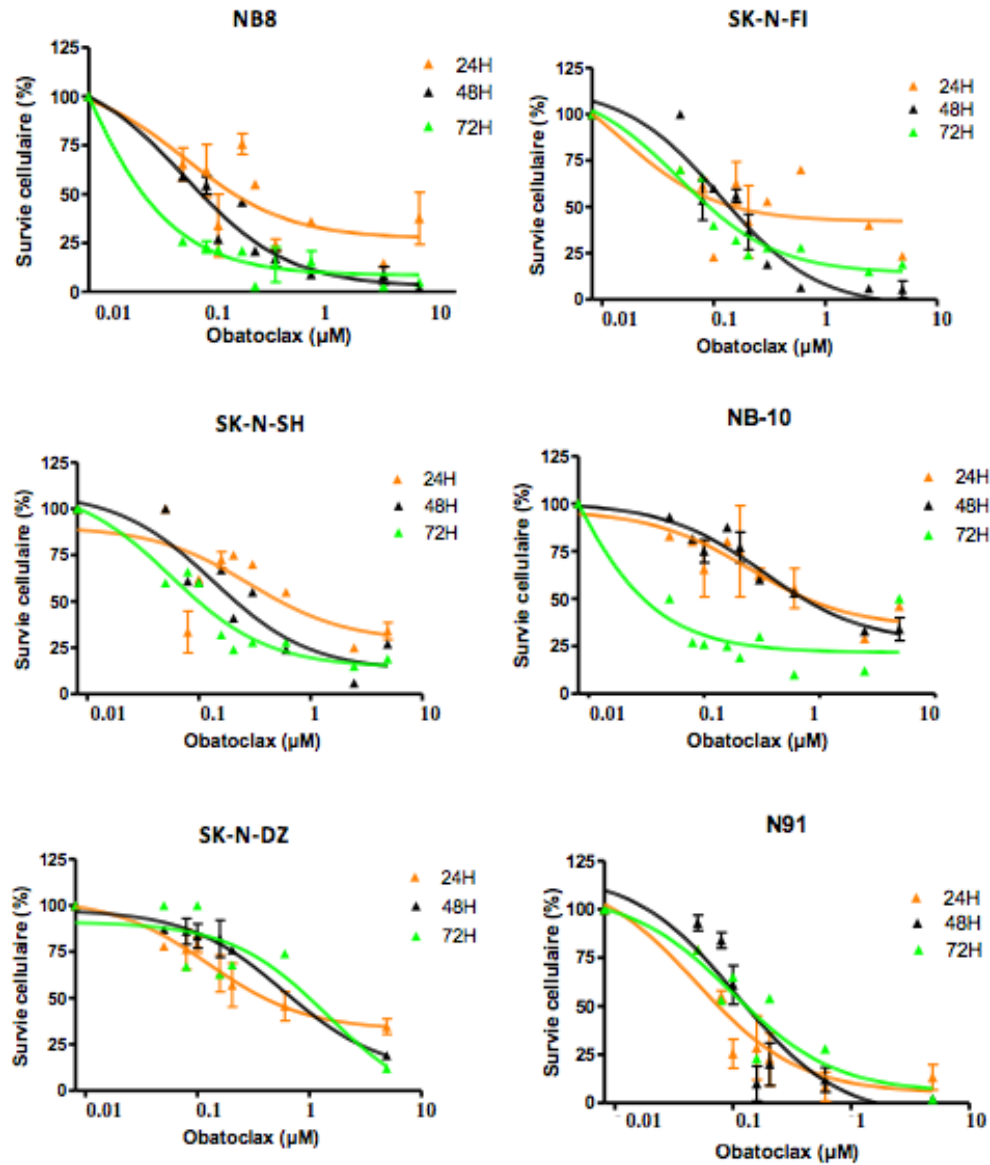


## 6.2 Étude d'un inhibiteur de Bcl-2, Obx, dans le NB

Cette deuxième partie des résultats sera consacrée à l'étude préclinique de l'Obx dans le NB.

### 6.2.1 Action d'Obx en monothérapie sur les cellules de NB

Afin de déterminer si les cellules de NB sont sensibles à l'Obx, nous avons traité 6 lignées cellulaires avec les concentrations suivantes : 0.05 $\mu$ M, 0.078 $\mu$ M, 0.10 $\mu$ M, 0.15 $\mu$ M, 0.2 $\mu$ M, 0.6 $\mu$ M, 5 $\mu$ M. À l'aide de test MTT, nous avons déterminé la survie cellulaire à chacune de ces concentrations pour un traitement de 24h, 48h et 72h. Les résultats de ces courbes de survies sont montrés à la figure 16A. À l'aide de ces résultats, l'IC50 de chaque lignée et pour chaque condition ont été déterminés et sont illustrés à la figure 16B. Les résultats démontrent une très grande sensibilité des cellules à l'Obx, avec une mort cellulaire accrue seulement 24h après les traitements. Le test statistique ANOVA unidirectionnel révèle que le temps d'incubation n'influence pas de manière significative la mort cellulaire pour les SK-N-FI, SK-N-DZ et N91 ( $p=0.2245$ ,  $p=0.14$  et  $p=0.9859$  respectivement). Par contre, le temps d'incubation serait significatif pour les NB10, NB8 et les SK-N-FI ( $p=0.001$ ,  $p=0.001$ ,  $p=0.0267$  respectivement).



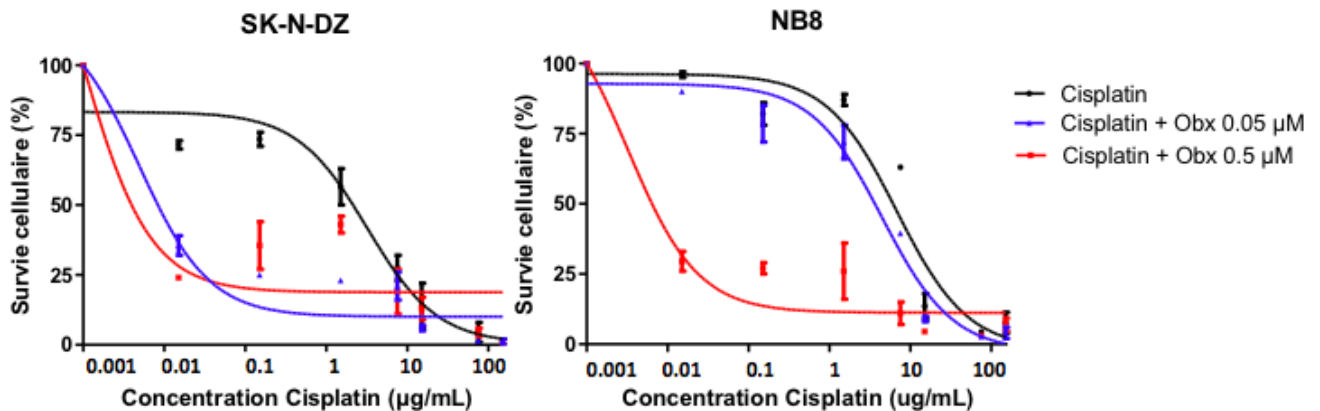
Lignée Cellulaire	IC 50 24h (µM)	IC 50 48h (µM)	IC 50 72h (µM)
NB8	0.052	0.052	0.005
SK-N-FI	0.014	0.011	0.005
SK-N-SH	0.028	0.134	0.056
NB10	0.246	0.330	0.004
SK-N-DZ	0.122	0.591	1.449
N91	0.051	0.120	0.099

**Figure 16 : Effet de l'Obx en monothérapie.** Les cellules des six lignées de NB sont traitées pendant 24, 48 ou 72 heures avec 7 concentrations différentes de d'Obx variant de

0.05 à 0.5  $\mu$ M (valeurs moyennes  $\pm$  erreur-type, n=3 expériences indépendantes). Les médicaments sont dilués en solution dans du milieu DMEM + 1% SVF. Les analyses statistiques ont été faites avec le test ANOVA-unidirectionnel (logiciel Graphpad Prism).

### **6.2.2 Étude de l'effet synergique Obx avec Cis**

Afin de déterminer si l'Obx a une action synergique avec le Cis, un agent anti-cancéreux classiquement utilisé dans le traitement du NB, nous avons effectué des tests de viabilité cellulaire sur les SK-N-DZ et les NB8 avec les concentrations de Cis suivantes: 0.015 $\mu$ g/mL, 0.15 $\mu$ g/mL, 1.5 $\mu$ g/mL, 7.5 $\mu$ g/mL, 15 $\mu$ g/mL, 75 $\mu$ g/mL, 150 $\mu$ g/mL. Nous avons combiné chacune de ces concentrations avec de l'Obx à 0.5 $\mu$ M et 0.05 $\mu$ M soit les IC50 respectifs de SK-N-DZ et NB8 à 48h. Les résultats des courbes de survie sont montrés à la figure 17A et un tableau regroupant les IC50 est illustré à la figure 17B. Les résultats démontrent que la lignée NB8 serait plus résistante aux thérapies que les SK-N-DZ. Une combinaison avec 0.05 $\mu$ M d'Obx serait suffisante pour diminuer significativement la survie cellulaire des SK-N-DZ (p=0.0267). Cette même concentration a aussi un effet marqué sur la viabilité cellulaire des NB8 diminuant l'IC50 de moitié. L'Obx à 0.5 $\mu$ M démontre un effet encore plus toxique dans les NB8 et un test statistique ANOVA unidirectionnel confirme que cette mortalité cellulaire est statistiquement significative p=0.0065.



Lignée Cellulaire	IC50 Cisplatin seul (µM)	IC50 Cisplatin + 0.05 Obactoclastax (µM)	IC50 Cisplatin + 0.5 Obatoclastax (µM)
SK-N-DZ	3.183	0.004	0.008
NB8	11.372	5.287	0.003

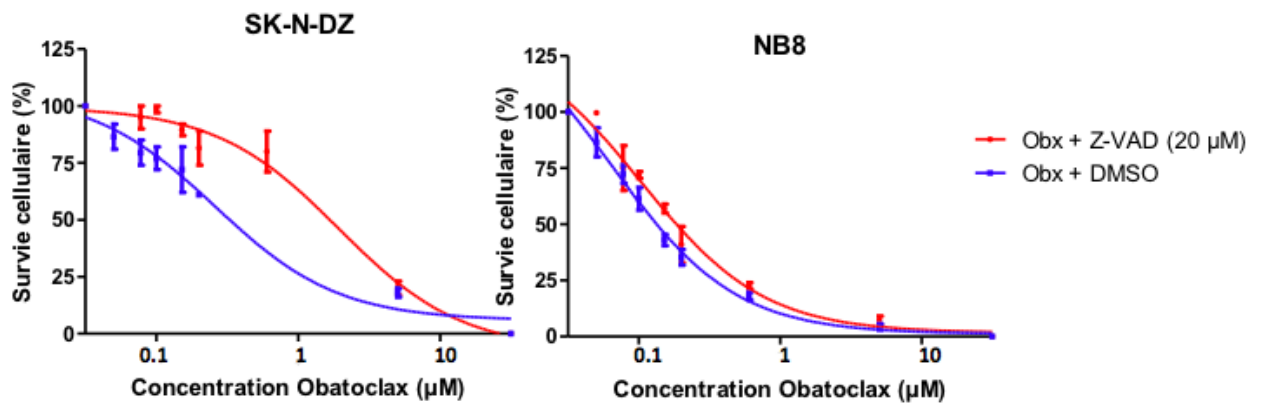
**Figure 17 : Obx en thérapie combinée avec le Cis.** Les cellules des deux lignées de NB sont traitées pendant 24 heures avec 7 concentrations différentes de Cis variant de 0.015 à 150 ug/mL en combinaison avec une concentration fixe d'Obx à 0.05 et 0.5 µM (valeurs moyennes ± erreur-type, n=3 expériences indépendantes). Les médicaments sont dilués en solution dans du milieu DMEM + 1% SVF. Les analyses statistiques ont été faites avec le test ANOVA-unidirectionnel (logiciel Graphpad Prism).

### 6.2.3 Étude de l'apoptose après traitement par Obx.

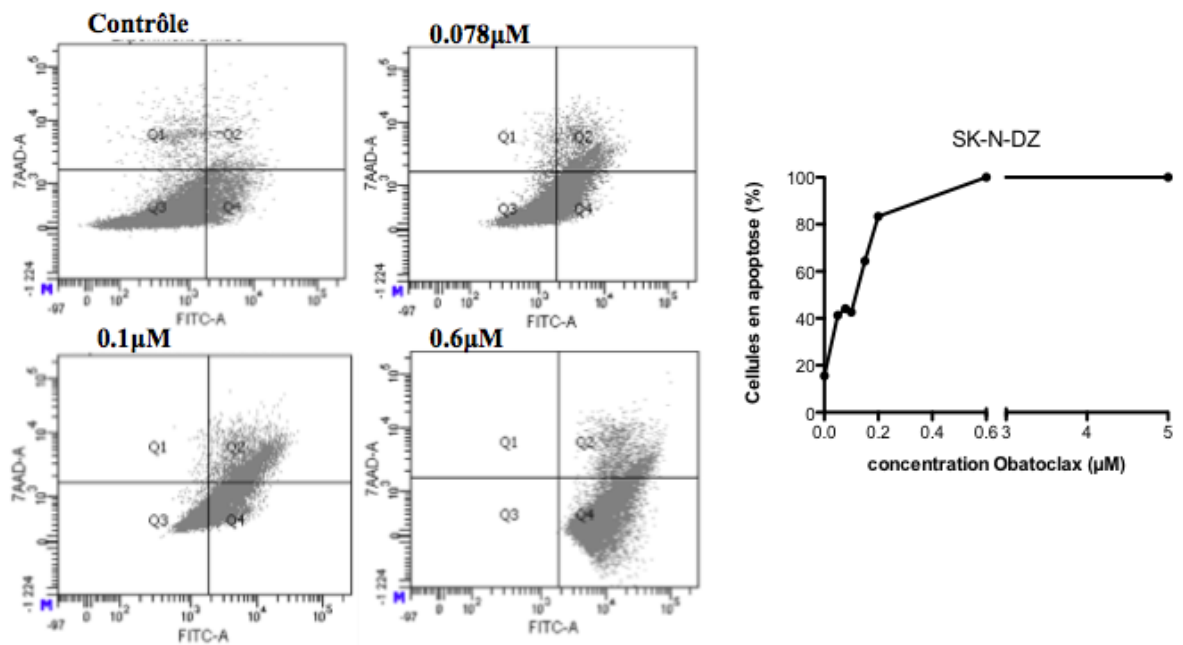
Nous avons ensuite voulu déterminer si l'Obx induit la mort cellulaire par apoptose. Pour ce faire, nous avons effectué des tests de viabilité cellulaire avec les concentrations d'Obx utilisées précédemment combinées à 20µM de Z-VAD-FMK, un inhibiteur de caspases. Les résultats illustrés à la figure 18A montrent que l'inhibition de l'apoptose augmente significativement la survie cellulaire pour les SK-N-DZ et NB8 (p=0.0258 et p=0.0108, respectivement) suggérant ainsi que l'Obx passe bien par la voie apoptotique pour induire la mort cellulaire. Ensuite, pour confirmer le pourcentage de cellules en apoptose nous avons marqué les cellules SK-N-DZ à l'Annexin-V et déterminé le pourcentage de mort cellulaire à l'aide d'un cytomètre de flux. Les résultats de la figure

18B démontrent qu'une augmentation croissante d'Obx corrèle au pourcentage total de cellules en apoptose.

A



B



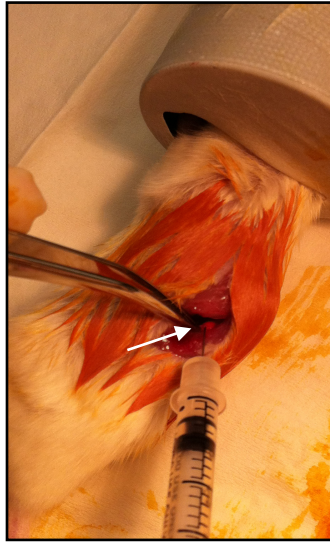
**Figure 18 : Effet de l'Obx sur l'apoptose. (A)** Les cellules des deux lignées de NB sont traitées pendant 24 heures avec 7 concentrations différentes d'Obx variant de  $0.05\mu\text{M}$  à

5 $\mu$ M en combinaison avec une concentration fixe de Z-VAD-FMK à 20 $\mu$ M (valeurs moyennes  $\pm$  erreur-type, n=3 expériences indépendantes). Les médicaments sont dilués en solution dans du milieu DMEM + 1% SVF. **(B)** Les cellules des deux lignés sont traitées pendant 48h heures avec 7 concentrations différentes d'Obx variant de 0.05 $\mu$ M à 5 $\mu$ M. Les médicaments sont dilués en solution dans du milieu DMEM + 1% SVF Elles sont ensuite incubées avec l'Annexin-V et le 7-AAD avant d'être analysées par cytométrie de flux. L'histogramme quantitatif représente la somme des cellules en Q2 et Q4. Les analyses statistiques ont été faites avec le test-(logiciel Graphpad Prism). **Q1** : nécrose **Q2** : apoptose tardive **Q3** : cellules vivantes **Q4** : apoptose précoce

#### **6.2.4 Obx confirme son effet anti-tumoral *in vivo***

Afin de déterminer si l'Obx conserve son activité anti-tumorale *in vivo*, nous avons procédé à une série d'injections orthotopiques (Figure 19A). L'injection orthotopique consiste à introduire directement les cellules tumorales dans la glande surrénale de la souris afin de reproduire le mieux possible les caractéristiques moléculaires et histologiques retrouvées chez le patient. Ensuite, nous avons laissé les tumeurs se développer 18 jours avant d'administrer les traitements d'Obx seul ou en combinaison avec Cis et de sacrifier les souris au jour 30. Nos résultats démontrent que l'Obx diminue significativement la taille de la tumeur (p=0.03) (Figure 19B et C). De plus, nous observons une baisse significative de métastases hépatiques. Cependant, nous ne pouvons interpréter aucun résultat de notre combinaison Obx et Cis ni de Cis seul. En effet, au jour 21 d'une première expérience nos souris injectées au Cis sont mortes d'une toxicité rénale (Figure 19B en rouge). Nous avons réalisé une seconde expérience, cette fois-ci en réhydratant les souris de saline (Figure 19B en rouge). Toutefois, l'efficacité de la réhydratation n'a pas suffi puisque les souris sont mortes au jour 23. Nous envisageons donc de faire une troisième expérience, où nous allons diminuer la dose administrée de Cis.

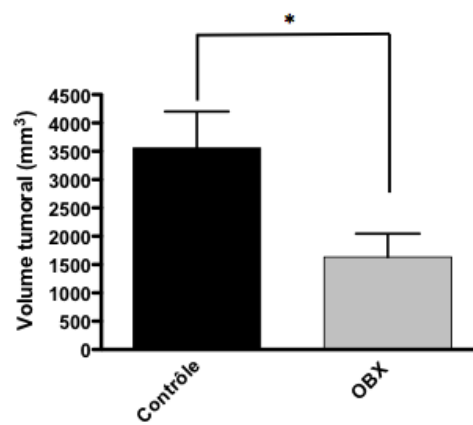
A



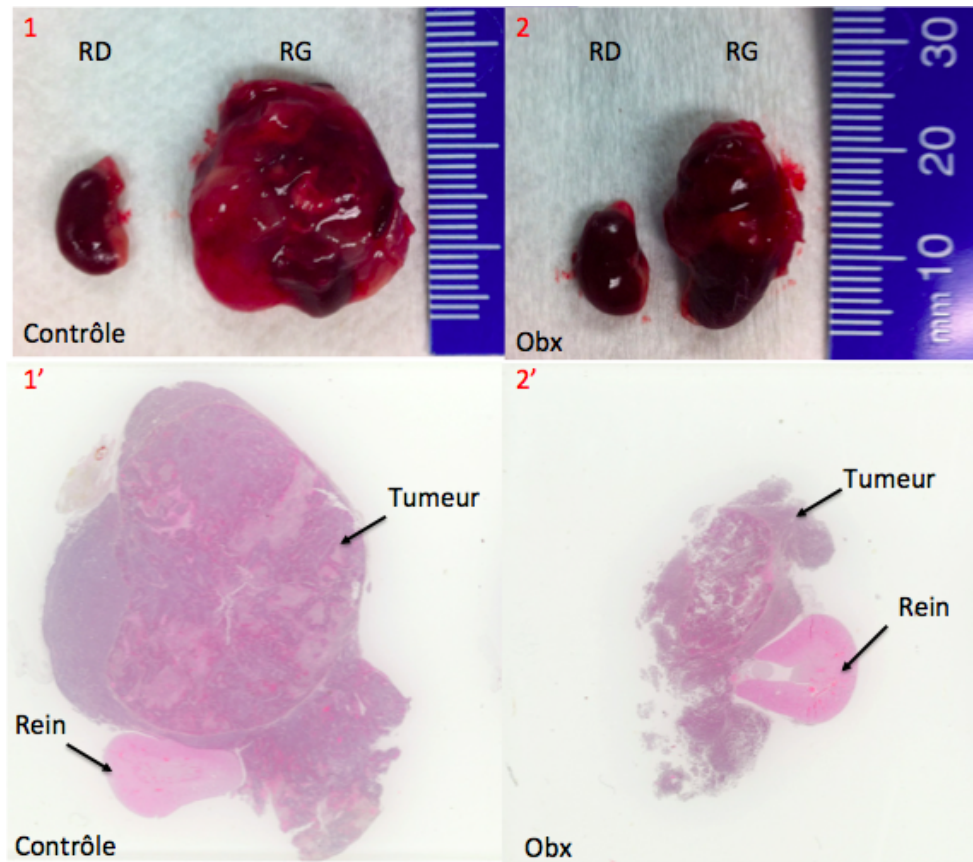
B

Traitement	Tumeur primaire		Métastases		
	Surrénale	Volume (mm <sup>3</sup> )	Poumons	Foie	Moelle Osseuse
Contrôle	6/6	3 559	6/6	6/6	0/6
OBX	6/6	1 630	5/6	1/6	0/6
CIS	3/3	0,592	0/0	0/0	0/3
OBX + CIS	2/3	17,5	0/0	0/0	0/3
OBX + CIS (H)*	3/3	293	1/3	0/0	0/3

\*H: Hydratation (500 µl saline/jour)



C



**Figure 19 : Obx seul diminue significativement la taille tumorale *in vivo*.** (A) Un million de cellules SK-N-DZ ont été injectées dans la glande surrénale gauche (flèche blanche) de souris humanisées NOD/SCID (B) Au jour 18 suivant la greffe, une dose d'Obx (3mg/kg/jour)<sup>148</sup>, utilisée seule ou en combinaison avec le Cis (8 mg/kg/jour)<sup>149</sup>, est injectée aux souris NOD/SCID. Les souris contrôles ont été injectées avec de la saline. Un tableau regroupant les différentes données histopathologiques de chaque traitement est illustré. (C) Des photos caractéristiques représentant la tumeur dans une souris contrôle et une souris traitée à l'Obx. 1' et 2' représentent des photos de coupes histologiques de ces mêmes tumeurs. Le rein droit n'a pas été injecté. **RD** : rein droit. **RG** : Rein gauche. Les analyses statistiques ont été faites avec le test-t (logiciel Graphpad Prism).



## Discussion

Le NB se caractérise par son comportement clinique d'une grande hétérogénéité, variant d'une régression spontanée de la tumeur à une évolution défavorable avec dissémination métastatique<sup>29,153</sup>. La stratification en groupe de risque en utilisant certains critères comme l'INSS, l'âge du patient et les facteurs biologiques a permis d'améliorer significativement les traitements. Malgré cela, une grande proportion de patients, soit 40%, succomberont à la maladie<sup>42</sup>.

La protéine PARP-1 est une enzyme nucléaire activée par les dommages d'ADN et joue un rôle crucial dans la réparation des SSB. L'inactivation de PARP-1 perturbera le mécanisme de réparation BER en rendant cette voie inactive. Il y aura une persistance accrue du nombre de SSB non réparés qui, lors de la réplication, deviendront des DSB. Les premières études avec les PARPi ont été effectuées sur les lignées tumorales du sein BRCA1/2 négatives. Puisque ces lignées possèdent déjà un mécanisme HR déficient, le traitement avec un PARPi s'est avéré extrêmement efficace<sup>154</sup>. Lorsque les mêmes études ont été faites sur des tumeurs du sein triples négatives, les résultats n'ont pas égalé les attentes. Ces résultats peu prometteurs ont pu être expliqués par l'absence ou la quasi-absence d'expression nucléaire de PARP-1 dans les tumeurs<sup>155</sup>. Ainsi l'absence de la cible protéique affecterait les résultats<sup>156</sup>.

Les études illustrant le rôle de PARP-1 dans la réparation d'ADN et les multiples autres processus biologiques ont grandement progressé ces dernières années<sup>157</sup>. Cependant, le niveau et l'étendue de l'expression de PARP dans plusieurs tumeurs sont encore largement inconnus mais sont présentement investigués dans le cancer du sein, de l'ovaire, du foie, du pancréas, du colon ainsi que dans les mélanomes et les glioblastomes<sup>156,158-163</sup>. Plus spécifiquement, il n'est pas encore évident si la surexpression de PARP-1 est caractéristique de certaines tumeurs, de leurs sous-types ou d'une sous-population de

cellules à l'intérieur d'une tumeur donnée. Cette connaissance s'avère être nécessaire afin d'évaluer les résultats des essais cliniques impliquant les PARPi.

Des études préliminaires ont démontré que les PARPi ont un effet synergique avec l'agent alkylant témozolomide dans le NB <sup>80</sup>. Ainsi, en vue d'une utilisation éventuelle des PARPi dans le traitement du NB, il est important de connaître le profil d'expression de PARP-1 dans les tumeurs de patients. Cependant, peu de choses sont connues sur le rôle de PARP-1 dans le NB et plus spécifiquement l'étendue de son expression protéique dans les spécimens cliniques. Ainsi, afin de déterminer l'expression de PARP-1 dans le NB et son association avec divers facteurs clinico-pathologiques, nous avons effectué des tests d'immunohistochimie. Nos résultats démontrent que la grande majorité des tumeurs (79.5%) de NB expriment PARP-1. Il y a une grande hétérogénéité tumorale quant à l'expression de cette protéine dans les cancers du NB avec certaines tumeurs qui ont une forte expression de celle-ci alors que d'autres ne l'expriment pas du tout. L'expression de PARP-1 est associée aux tumeurs ayant un bon pronostic malgré qu'il n'y ait pas de corrélation avec la survie du patient à long terme. En effet, les enfants diagnostiqués après l'âge d'un an démontrent une expression de PARP-1 significativement moins élevée que ceux ayant reçu un diagnostic avant 365 jours. Cependant, dans les tumeurs avec une amplification de *MYCN*, un facteur de très mauvais pronostic dans le NB, l'expression de PARP-1 est moins importante que dans celles sans amplification mais la différence n'est pas significative. De plus, on retrouve un marquage de PARP-1 significativement plus élevé dans les stades non métastatiques 1 et 2 en comparant aux stades métastatiques 3 et 4. On retrouve aussi une surexpression significative de PARP-1 dans les tumeurs par rapport aux contrôles ce qui est aussi retrouvé dans plusieurs autres tumeurs incluant le sein, l'ovaire, le poumon, les cancers de la peau, le glioblastome et les lymphomes non Hodgkiniens <sup>164</sup>.

Une étude récente effectuée dans les tumeurs du pancréas a aussi illustré des résultats similaires <sup>159</sup>. En effet, Klauschen et *al.* démontrent que l'augmentation de l'expression de PARP-1 est corrélée à une prolongation de la survie, et ce, non seulement dans la cohorte totale mais aussi dans plusieurs sous-groupes de patients. L'expression élevée de PARP-1 associée avec les tumeurs de bon pronostic corrèle avec son rôle dans la réparation d'ADN, ce qui est aussi en accord avec une diminution de son expression dans les tumeurs de mauvais pronostic. De plus, d'autres études suggèrent que les tumeurs plus agressives ont une diminution de PARP-1 <sup>165</sup>. Ainsi, nous pouvons supposer que PARP-1 ne joue probablement pas un rôle précoce dans la cancérogénèse mais agit possiblement à une étape ultérieure en augmentant la malignité des tumeurs <sup>159</sup>. De plus, nous pouvons également supposer que la diminution d'expression de PARP-1 se traduit par une incapacité de résister aux avancements d'une progression néoplasique menant à une tumeur de mauvais pronostic <sup>166</sup>. En effet, le mécanisme moléculaire de la perte d'expression de PARP-1 lié à la transformation maligne est probablement dû à l'instabilité génomique facilitant la perte des gènes suppresseurs de tumeurs et l'activation des oncogènes <sup>167</sup>.

La hausse d'expression de PARP-1 dans les tumeurs de bon pronostic est aussi en accord avec nos résultats illustrant une hausse d'activité enzymatique de PARP-1 dans les cellules CD133<sup>bas</sup>. De nombreuses études suggèrent que les cellules CD133<sup>haut</sup> forment des tumeurs plus agressives, et ce, dans les cellules tumorales du glioblastome multiforme, du colon, du médulloblastome, de l'épendyome et du pancréas. De plus, dans le NB, le potentiel agressif des CSC CD133<sup>haut</sup> a déjà été démontré <sup>129</sup>. Ces résultats corrélerent avec notre immunohistochimie confirmant que les cellules et les tumeurs agressives de NB ont une activité et une expression de PARP-1 significativement réduite.

Cependant, cette sous-expression de PARP-1 dans les tumeurs agressives n'est pas retrouvée dans tous les cancers. En effet, on retrouve une association entre la surexpression de PARP-1 et les tumeurs agressives dans les cancers du foie, de l'ovaire, du sein ainsi que

dans les mélanomes <sup>158,160,168,169</sup>. De plus, d'autres résultats suggèrent que l'expression de PARP-1 est plus élevée dans les CSC du carcinome hépatocellulaire <sup>170</sup>. Dans les tumeurs primaires des carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale, une étude immunohistochimique démontre une association entre l'expression élevée de PARP-1 et l'agressivité des tumeurs. Plus spécifiquement ce serait les CSC Nestin<sup>haut</sup> qui seraient associées à une forte expression de PARP-1 <sup>171</sup>. Cette équipe suggère que cette expression aide les tumeurs à résister au stress génotoxique en augmentant leur résistance aux agents génotoxiques ce qui peut mener à la radio et chimiorésistance <sup>171</sup>. Plusieurs mécanismes supportent le rôle de PARP-1 dans la progression tumorale comme son implication dans l'angiogenèse et la prolifération <sup>172,173</sup>. PARP-1 a aussi été associé au cancer par l'activation de NF-κB <sup>174</sup>. De plus, dans certain cas, la surexpression de PARP-1, causée par un clivage déficient, résulte en une diminution de l'apoptose dans la tumeur <sup>175</sup>. Cette association de PARP-1 dans les tumeurs agressives et dans celle de bon pronostic semble contradictoire et plus d'études sur la fonction biologique de PARP-1 seront nécessaires.

Notre prochaine étape a été d'évaluer le traitement en monothérapie d'un PARPi, l'AG, sur nos lignées cellulaires de NB. Malgré des IC50 très variables, entre 3 et 14μM, nous pouvons conclure que les cellules de NB sont peu ou pas sensibles au traitement par AG seul. Ces résultats concordent avec d'autres études effectuées avec l'AG dans d'autres tumeurs solides, incluant le NB, qui démontrent que lorsque utilisé seul, le PARPi n'a pas d'effet antiprolifératif *in vitro* et *in vivo* avec des IC50 allant de 8μM à 94μM dans les cellules cancéreuses du colon <sup>80,176,177</sup>. Les PARPi seraient relativement non-toxiques car ils n'endommagent pas directement l'ADN et seraient seulement efficaces en monothérapie dans les tumeurs ayant déjà un mécanisme de réparation déficient <sup>178</sup>. À l'aide d'un test d'Essaie Colorimétrique Universel nous avons confirmé que cette résistance n'est pas causée par une faible activité inhibitrice d'AG. En effet, nous observons une inhibition dose dépendante de PARP-1 avec environ 90% d'inhibition enzymatique à 4μM pour nos deux lignées cellulaires.

Ensuite, nous avons voulu déterminer si notre PARPi potentialiserait les effets toxiques de la Doxo, un agent chimiothérapeutique génotoxique classiquement utilisé dans le traitement du NB. À ce jour, aucune étude sur une telle combinaison n'a été étudiée dans le NB. La Doxo est une antracycline qui produit non-seulement des radicaux hydroxyl réactifs mais interagit aussi avec la Topoisomérase II (TOP II), une protéine ayant un rôle essentiel dans la réplication, ce qui conduit à la rupture de l'ADN. Ainsi, sa combinaison avec un PARPi serait logique car l'absence de PARP-1 devrait amplifier ces dommages.

Nos résultats démontrent qu'une combinaison avec 4 $\mu$ M d'AG ne semble pas potentialiser significativement les effets de la Doxo sur nos 5 lignées cellulaires. En effet, nous n'observons aucun effet significatif sur la viabilité cellulaire de nos lignées en présence, ou non, de notre PARPi. Cependant, dans le NB, l'AG a significativement potentialisé les effets de la Témazolomide et le Topotécan, et ce, lorsqu'utilisé à une concentration 10 fois plus petite soit 0.4 $\mu$ M<sup>80</sup>. Cette combinaison s'est aussi avérée efficace dans les cellules du carcinome du colon<sup>176,177</sup>. De plus, dans les tumeurs solides, la combinaison Témazolomide et AG a prouvé son action dans une étude de phase I<sup>79</sup>. Ainsi, nous pouvons supposer que le type de dommage à l'ADN causé par l'agent génotoxique utilisé aura un impact sur l'efficacité d'une combinaison avec un PARPi<sup>179</sup>.

L'agent anticancéreux Témazolomide est un agent alkylant et son interaction avec l'ADN génère un large éventail d'adduits alkylant dont les trois bases principalement modifiées sont la guanine en position N<sup>7</sup> (70%) et O<sup>6</sup> (6%) ainsi que l'adénine en position N<sup>3</sup> (5%)<sup>79,180</sup>. Cependant, les lésions méthylguanine-N7 et la méthyladénine-N3 formés par Témazolomide ne contribuent pas significativement à sa cytotoxicité car ils sont rapidement réparés par le mécanisme BER<sup>79</sup>. La cytotoxicité des inhibiteurs de TOP I comme Topotécan, sont aussi potentialisés par les PARPi. La TOP I clive, déroule et diminue la torsion de l'ADN et son inhibition cause des bris d'ADN. Il a été démontré que ces inhibiteurs activaient PARP-1 et que l'inhibition de ce dernier augmente la cytotoxicité

<sup>179</sup>. Des études ont également démontré que les inhibiteurs de TOP I avaient un meilleur effet toxique dans les cellules déficientes dans la machinerie BER comparée aux cellules BER compétentes <sup>181</sup>. Ainsi, le Témazolomide et le Topotécan causent des lésions qui affectent directement le mécanisme BER et par conséquent l'inhibition de PARP-1 serait plus toxique.

Cependant, des études dans les carcinomes hépatocellulaires et le cancer du sein démontrent que l'inhibition de PARP-1 ne potentialise pas les effets toxiques des inhibiteurs de TOP II <sup>170,179,182,183</sup>. Ces inhibiteurs de TOP II, tel que la Doxo, ne semblent pas causer des lésions nécessitant la réparation BER <sup>179</sup>. Dans les cellules tumorales des hépatocarcinomes, le traitement à l'Étoposide, un second inhibiteur de TOP II, n'active pas PARP-1, et ce, malgré des niveaux significatifs de dommage à l'ADN <sup>179</sup>. De plus, aucune activation de PARP-1 n'est observée à la suite d'un traitement supraléthel avec 17 $\mu$ M d'Étoposide <sup>179</sup>.

Ainsi, cette absence d'activation de PARP-1 associée aux dommages créés par les inhibiteurs de TOP II, et, par conséquent l'inefficacité d'une combinaison avec un PARPi, est en accord avec nos résultats d'immunofluorescence de  $\gamma$ H2Ax et d'Annexin-V. En effet, nous n'observons aucune augmentation significative de bris d'ADN lorsque notre PARPi est combiné à la Doxo comparé à la Doxo seule, et ce, pour nos 3 lignées cellulaires. De plus, l'apoptose n'augmente pas suite à cette combinaison et la mort cellulaire observée peut être entièrement attribuée aux effets toxiques de la Doxo. Cette combinaison semble diminuer la viabilité cellulaire des CSC CD133<sup>haut</sup>, et ce, uniquement dans une lignée cellulaire. Cependant, ces résultats restent à confirmer. Une étude effectuée dans les cellules tumorales du cancer du sein, suggère également que cette combinaison n'augmente pas les lésions d'ADN <sup>183</sup>. Ces résultats démontrent aussi qu'AG ne potentialise pas les effets de la Doxo *in vivo* <sup>183</sup>. De plus, une étude a tenté de déterminer si l'absence de certains mécanismes de réparation influait sur la toxicité des PARPi en combinaison avec

d'autres agents anticancéreux <sup>182</sup>. Les résultats suggèrent que PARPi ne potentialise pas les effets de Doxo dans les cellules ayant un mécanisme de réparation HR fonctionnel <sup>182</sup>.

Toutefois, les résultats concernant la combinaison AG et Doxo sont encore controversés et semblent dépendre des types de lignées cellulaires étudiées <sup>179,180</sup>. En effet, une étude récente dans les cellules tumorales du foie démontre que l'inhibition de PARP-1 augmente la sensibilité des cellules aux traitements de Doxo <sup>184</sup>. Cette même équipe a aussi illustré que dans les cellules tumorales du cancer du sein négatives en p53, un gène suppresseur de tumeur, le traitement à la Doxo active PARP-1 et l'inhibition de ce dernier augmente les effets génotoxiques de cet inhibiteur de TOP II <sup>185</sup>.

Notre prochaine étape a été d'étudier les effets d'AG en combinaison avec un second agent chimiothérapeutique, le Cis. Ce dernier est un complexe à base de platine qui se fixe directement sur l'ADN et induit une variation de conformation qui empêche la réplication. Les composés à base de platine sont parmi les médicaments les plus largement utilisés et les plus efficaces contre le cancer. De ce fait, le Cis est couramment utilisé dans le traitement du NB. Nous avons voulu déterminer si une thérapie combinée avec un PARPi augmente la cytotoxicité de celui-ci dans les lignées cellulaires de NB. Nos résultats démontrent que cette combinaison n'augmente pas significativement la mort cellulaire. Cependant, ces résultats sont en accord avec d'autres études effectuées dans les lignées tumorales du cancer de l'ovaire, du poumon et du sein où l'ajout d'un PARPi ne potentialise pas les effets de Cis <sup>182,186,187</sup>. En effet, il a été démontré que dans les lignées cellulaires du NSCLC, PARP-1 n'est pas activé suite au traitement de Cis, et ce, dans les lignées parentales et les lignées résistantes au Cis <sup>187</sup>. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'activité enzymatique de PARP-1 n'est pas un facteur critique dans la réparation des dommages induits par Cis, et son inhibition n'aura aucun effet sur la viabilité cellulaire <sup>187</sup>. Les dommages causés par Cis semblent activer les mécanismes HR et d'anémie de Fanconi bien que les détails concernant la façon dont les mécanismes accomplissent la réparation

reste inconnue<sup>188,189</sup>. En effet, une étude effectuée dans les lignées cellulaires du cancer du sein démontre que dans les lignées cellulaires avec un mécanisme HR non-fonctionnel, l'ajout du PARPi ne potentialise pas les effet du Cis<sup>182,190</sup>.

Comme pour la Doxo, l'efficacité de la combinaison semble être dépendante de la lignée cellulaire étudiée. En effet, dans les cellules tumorales des carcinomes hépatocellulaires, une étude suggère que le PARPi augmente la cytotoxicité du Cisplatine *in vitro*<sup>191</sup>. Toutefois, il est important de mentionner que le PARPi utilisé dans cette étude inhibe la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* même lorsqu'utilisé seul. Aussi, des souris xénotransplantées avec des cellules tumorales du sein ont démontré une régression tumorale *in vivo* significative lorsqu'un PARPi est combiné au Cis comparé au Cis seul<sup>192</sup>.

Nous avons ensuite voulu déterminer si la voie de signalisation PI3K/PTEN/AKT était modulée à la suite de nos traitements d'AG en monothérapie ou en combinaison avec Doxo. AKT, une sérine-thréonine kinase, est à la base des voies de signalisation et de presque tous les récepteurs tyrosine-kinase. En régulant l'activité de plusieurs kinases et facteurs de transcription, AKT augmente la prolifération cellulaire et la synthèse protéique, elle influence le cycle cellulaire et inhibe l'apoptose. La voie PI3K, dont elle fait partie, est l'une des voies de signalisation pro-survie la plus puissante et régule les cascades de signalisation de plusieurs mécanismes cellulaires. D'ailleurs, cette voie est l'une des plus cruciales pour le développement et le maintien du cancer et est souvent dérégulée dans une multitude de tumeurs<sup>193,194</sup>.

Étonnamment, nos résultats démontrent une activation de la voie AKT lorsqu'AG est ajouté à Doxo malgré qu'aucune activation de pAKT ne soit observée lorsqu'AG est incubé seul. Nos résultats sont similaires à une étude réalisée sur les cellules HeLa (provenant d'un cancer du col utérin), où l'ajout d'un PARPi à Paclitaxel, un agent anticancéreux qui



interfère avec les microtubules, augmente pAKT <sup>151</sup>. Plusieurs études ont démontré que l'activation de la voie PI3K/AKT est fortement impliquée dans le mécanisme de résistance des cellules à plusieurs agents anticancéreux incluant la Doxo <sup>195,196</sup>. Ainsi, cette activation d'AKT par l'inhibition de PARP-1 pourrait contrer les effets de la Doxo et pourrait, en partie, expliquer l'absence de synergie que nous avons observé entre ces deux agents. En effet, la combinaison d'un PARPi au Paclitaxel diminuait le relâchement mitochondrial du cytochrome C et, la résistance des cellules conférée par l'ajout du PARPi, est contrée par l'inhibition de la voie PI3K/AKT <sup>151</sup>.

La seconde voie de signalisation d'importance que nous avons décidé d'investiguer est la voie des MAPK. Cette dernière comprend les kinases ERK, JNK et p38 qui sont activées par divers stimuli incluant les facteurs de croissances et les cytokines <sup>197</sup>. Plusieurs études suggèrent l'implication de ERK dans la l'inhibition de la mort cellulaire soit par régulation transcriptionnelle ou par inhibition directe de la machinerie apoptotique <sup>198</sup>. De plus, la voie des MAPK est très souvent impliquée dans les mécanismes de résistance cellulaire et joue un rôle dans la résistance des cellules à la Doxo <sup>199,200</sup>.

De façon surprenante, nos résultats démontrent une activation de la voie MAPK lorsqu'AG est ajouté à Doxo malgré qu'aucune activation de pERK ne soit observée lorsqu'AG est incubé seul. Une étude a démontré que l'ajout d'un PARPi conférerait une cytoprotection aux cellules Hela traitées avec l'agent alkylant MNNG (N-méthyl-NO-méthyl-nitro-N-nitrosoguanidine) <sup>152</sup>. En effet, la combinaison du PARPi au MNNG inhibait la mort cellulaire induite par ce dernier en augmentant la phosphorylation de ERK. De plus, l'ajout d'un inhibiteur de MAPK restaurait la sensibilité cellulaire au MNNG. Ainsi, cette activation de ERK par l'ajout d'un PARPi pourrait expliquer l'absence significative de mort cellulaire que nous avons observé lorsque AG est combiné à Doxo.

La découverte de plusieurs facteurs moléculaires impliqués dans la progression tumorale a permis de développer des nouvelles stratégies thérapeutiques dans l'espoir d'améliorer les traitements. Un de ces facteurs est la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Plusieurs études ont démontré que Bcl-2 est fortement exprimé dans les tumeurs de patients ayant un stade avancé de la maladie (stade 3 et 4), celles ayant une histologie défavorable ainsi que celles ayant une amplification de *MYCN*<sup>96</sup>. L'analyse des protéines anti-apoptotique Bcl-2 et Mcl-1 ont démontré une forte expression dans les tissus de NB<sup>201</sup>. De plus, les niveaux de mRNA de Bcl-2 sont beaucoup plus élevés dans les NB que toutes autres tumeurs et tissus sains<sup>202</sup>. Ceci suggère que l'inhibition de Bcl-2 serait une bonne cible de traitement à envisager pour le NB.

Nous avons utilisé, dans le cadre des études présentées dans ce mémoire, un inhibiteur de petite molécule appelé Obx ou GX15-070. L'Obx est un inhibiteur de protéine anti-apoptotique Bcl-2 et inhibe avec succès tous les membres de cette famille, soit Bcl-XL, Bcl-2, MCL-1, Bcl-w, A1 et Bcl-b<sup>203</sup>. Il y a présentement 16 études cliniques, en cours ou complétées, ayant étudié l'efficacité d'Obx dans une multitude de cancers. En effet, Obx a démontré un effet antitumoral marqué dans plusieurs tumeurs hématologiques. Nous retrouvons des essais cliniques pour les tumeurs, tels que les leucémies lymphocytaires chroniques, les leucémies aiguës, les myélomes multiples ainsi que les lymphomes non-Hodgkiniens<sup>204</sup>. Cependant, les études dans les tumeurs solides n'en sont qu'à des phases très précoces et quelques résultats préliminaires démontrent une efficacité du traitement dans les cellules pancréatiques et les cellules du cholangiocarcinome ainsi que dans les tumeurs de l'œsophage, du poumon et dans les mélanomes<sup>204</sup>.

Nos résultats démontrent que l'Obx utilisé en monothérapie a un effet anti-tumoral marqué dans les cellules de NB. Aussi, nous observons que l'Obx sensibilise les cellules de NB au traitement de Cis. De plus, dans les souris transplantées orthotopiquement, le traitement à l'Obx a réduit la croissance tumorale. Nous pouvons conclure que Bcl-2 est une cible

potentielle dans le NB et que des expériences *in vivo* supplémentaires, et éventuellement chez des patients, seront nécessaires.

Les cellules de NB montrent une sensibilité marquée au traitement d'Obx avec des IC50 variant de 0.014 à 1.449 $\mu$ M à 72h. Ces IC50 diminuent significativement avec le temps dans la moitié de nos lignées cellulaires. Nos résultats sont comparables à des études effectuées dans les cellules de myélome multiple où les IC50 de 16 lignées cellulaires varient entre 0.052 à 1.100 $\mu$ M pour 72h de traitement<sup>113</sup>. Cette étude a démontré que la sensibilité des cellules aux traitements d'Obx corrélait avec les niveaux protéiques basaux des différents membres de la famille Bcl-2. Plus spécifiquement, ce sont les cellules qui sous-exprimaient Bcl-xL qui étaient les plus sensibles alors que celles qui exprimaient fortement toutes les 3 protéines anti-apoptotique Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-xL étaient plus résistantes. Une étude effectuée par Shoemaker et *al.* indique que l'IC50 de GX015-070 pour Bcl-xL est 4 fois plus élevé que pour Mcl-1, ainsi on s'attend à ce que les lignées qui surexpriment Bcl-xL soient plus résistantes<sup>205</sup>. De plus, puisque l'Obx est une molécule mimétique des protéines pro-apoptotiques BH3-unique, une relation directe a été observée entre les courbes dose-réponse et l'absence ou la quasi-absence des protéines Bak dans la cellule<sup>113</sup>. Par conséquent, l'Obx en monothérapie aura une plus grande efficacité dans les tumeurs qui auront une expression réduite, absente ou inactivée de Bcl-xL et Bak<sup>113</sup>.

Dans le NB, une étude semblable a été effectuée avec un autre inhibiteur de Bcl-2, le ABT-737<sup>202</sup>. ABT-737 est une molécule mimétique des protéines pro-apoptotique BH3-unique qui lie très spécifiquement les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w mais elle n'a aucune affinité pour A1 et Mcl-1<sup>206</sup>. Les résultats démontrent une sensibilité cellulaire très variée allant de 0.1 $\mu$ M à plus de 100 $\mu$ M. Cette sensibilité réduite dans certaines lignées a aussi été retrouvée dans une seconde étude impliquant le ABT-737 en monothérapie dans les cellules de NB<sup>207</sup>. Les résultats suggèrent que les lignées ayant une forte expression de Bcl-2 étaient plus sensibles au traitement que celles qui sous-exprimaient celle-ci<sup>202</sup>. De

plus, les lignées avaient un meilleur taux de réponse si elles avaient une sous-expression de A1 et Mcl-1 <sup>202</sup>.

Puisque dans une tumeur on retrouve une grande hétérogénéité cellulaire, les traitements en monothérapie seraient beaucoup plus efficaces avec un inhibiteur trans-Bcl-2, comme Obx, qu'avec un inhibiteur beaucoup plus spécifique, comme ABT-737 <sup>208</sup>. En effet, un des mécanismes de résistance souvent relié au traitement de l'ABT-737 est la surexpression de Mcl-1 dans les cellules <sup>209</sup>. Dans une étude effectuée sur les lymphomes à grandes cellules B, trois mécanismes par lesquels la résistance à l'ABT-737 se développe, ont été caractérisés <sup>210</sup>. Le premier mécanisme de résistance de la cellule survient suite à l'inhibition des protéines activatrices pro-apoptotiques Bid et Bim. Le deuxième mécanisme implique la baisse d'expression des protéines Bax et Bak. Finalement la résistance peut se développer suite à la surexpression de toutes les protéines anti-apoptotiques <sup>210</sup>.

Dans les leucémies lymphocytaires chroniques des traitements en monothérapie avec Obx, les cytotoxicités varient entre 0.86 à 5.08 $\mu$ M et pour les cellules cancéreuses de l'AML la médiane des IC50 est de 3.6 $\mu$ M <sup>211,212</sup>. Ainsi, les effets toxiques de l'Obx sont dépendants de la dose et des différences sous-jacentes de chaque tumeur et les effets thérapeutiques les plus convaincants se trouvent dans les combinaisons avec d'autres agents anti-cancéreux <sup>208</sup>.

Nos résultats démontrent qu'une combinaison de GX015-070 avec Cis diminue significativement la survie cellulaire de deux lignées de NB. En effet, des doses aussi petites que 0.05 $\mu$ M ont été suffisantes pour induire une augmentation significative de la cytotoxicité dans les SK-N-DZ et les NB8. Puisque le Cis est un agent à base de platine qui forme des pontages entre les brins d'ADN ; il active les mécanismes de réparation d'ADN et, si la réparation est trop importante, l'apoptose sera enclenchée et passera par la voie

mitochondriale<sup>213</sup>. Cette voie nécessite le relâchement des cytochromes C par les ports mitochondriaux et est inhibée par Bcl-2<sup>214</sup>. Ainsi, une surexpression de Bcl-2 dans les cellules inhibe cette apoptose et l'utilisation d'une molécule comme Obx re-sensibiliserait les cellules à cet agent anticancéreux. En effet, dans les cellules cancéreuses du poumon non à petites cellules résistantes au Cis, une association avec 0.5µM d'Obx était suffisante pour contrer significativement leur résistance au traitement<sup>215</sup>. Les cellules du cancer colorectal résistante à l'Oxiplatin, un second agent à base de platine, ont aussi vu leur sensibilité augmentée en présence d'Obx<sup>215</sup>.

Dans le NB, une combinaison de ABT-737 avec Cis, Vincristine, Étoposide et Doxo a été effectuée<sup>202</sup>. Tous ces agents anticancéreux activent la voie apoptotique intrinsèque et leur combinaison avec l'inhibiteur de Bcl-2 augmente de façon synergique leur toxicité dans les lignées cellulaires<sup>202, 213</sup>. D'autres études illustrent que les cellules de lymphomes non-Hodgkiniens traitées avec Cis, Doxo ou Vincristine démontrent une augmentation synergique de la mort cellulaire en présence d'Obx<sup>216</sup>. Cette augmentation synergique de la sensibilité cellulaire lorsque GX-015-070 est combiné à d'autres agents chimiothérapeutiques a aussi été retrouvée dans les leucémies lymphoblastiques aiguës et les lymphomes à cellules B, les myélomes multiples, les cancers pancréatiques, les cholangiocarcinomes, les cancers du sein et les cancers de l'œsophage<sup>107,217-221</sup>. Ainsi, il semblerait que les inhibiteurs de Bcl-2 soient capables de sensibiliser les cellules tumorales aux agents anticancéreux classiques et d'inverser la résistance causée par la dérégulation de la machinerie apoptotique.

Nos prochains résultats démontrent que l'Obx induit bien l'apoptose dans les lignées cellulaires de NB. En effet, en combinant l'Obx à un inhibiteur de caspases, le Z-VAD-FMK, la survie cellulaire des SK-N-DZ et des NB8 est significativement augmentée, soulignant ainsi le rôle de GX015-070 dans l'activation de la cascade apoptotique. Cette augmentation de cellules en apoptose est confirmée par le test d'Annexin-V dont les

résultats illustrent un accroissement de la mort cellulaire programmée corrélée à une augmentation croissante des concentrations d'Obx témoignant ainsi les effets antiprolifératifs de cet agent.

Des études effectuées dans des cellules de l'AML en monothérapie avec Obx ont aussi suggéré que ce dernier induisait bien l'apoptose par la voie mitochondriale<sup>212</sup>. En effet, ce groupe a démontré que des traitements d'Obx sur des mitochondries isolées augmentaient significativement l'échappement du cytochrome C dans le cytoplasme. Cet effet de l'Obx sur la voie intrinsèque serait en partie causé par la libération de Bak par Mcl-1, la dissociation de Bim par Bcl-2 et Mcl-1 et la formation du complexe Bax/Bak<sup>212</sup>. De manière étonnante, l'absence complète de Bax et Bak n'éliminerait pas complètement l'apoptose induite par Obx contrairement à son homologue ABT-737<sup>212</sup>. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'Obx aurait des cibles multiples et induirait aussi la mort cellulaire par un autre mécanisme.

De multiples études ont démontré le rôle de l'Obx dans l'autophagie, appelé aussi mécanisme de mort cellulaire programmé II<sup>220,222-225</sup>. L'autophagie est un processus catabolique, impliquant un réarrangement dynamique des membranes et la formation des autophagosomes et des autolysosomes. La présence abondante de vacuoles autophagiques dans les cellules mourantes de plusieurs organismes suggère que l'autophagie joue un rôle causal dans la mort cellulaire. Beclin-1 est un initiateur d'autophagie qui contient un domaine BH3 et il est inhibé par les protéines pro-survie Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w et Mcl-1<sup>226</sup>. Cependant, seules les protéines anti-apoptotiques Bcl-2/xL ciblées au réticulum endoplasmique peuvent inhiber l'autophagie induite par Beclin-1. Ainsi, l'inhibition des protéines de la famille Bcl-2 par une molécule BH3-mimétique comme Obx, libère beclin-1 qui peut ensuite initier la cascade autophagique<sup>227</sup>. Cette séparation de Beclin-1 des protéines pro-survie serait un moyen d'induire une autophagie toxique dans les cellules

cancéreuses<sup>228</sup>. De plus, il a été démontré qu'en l'absence de Bax et Bak, l'induction de l'autophagie est utilisée par défaut comme un mécanisme de mort cellulaire<sup>229</sup>.

Malgré cela, le rôle de l'autophagie dans le cancer est encore controversé car il est non seulement un processus de suicide cellulaire induit par la radiation ou le stress, mais il peut aussi être un mécanisme de survie cytoprotecteur<sup>230</sup>. Dans les cellules cancéreuses de l'œsophage et de l'ostéosarcome, l'inhibition de l'autophagie augmente la cytotoxicité de GX015-070 ce qui valide l'hypothèse d'un mécanisme cytoprotecteur<sup>220</sup>. Cependant, une étude semblable dans les cellules cancéreuses du pancréas suggère que l'autophagie induite par GX015-070 participe à la mort cellulaire<sup>225</sup>. Plusieurs études restent à faire, mais ces résultats contradictoires sont expliqués par l'unicité de chaque tumeur<sup>220</sup>.

Notre prochaine étape a été de vérifier si la sensibilité à l'Obx des lignées cellulaires de NB *in vitro* se traduit par une diminution de la masse tumorale *in vivo*. Nous avons procédé à des greffes orthotopiques car celles-ci reproduisent les caractéristiques moléculaires et histologiques les plus près de celles retrouvées dans la tumeur originale du patient. Nos résultats démontrent que l'Obx diminue significativement la masse tumorale *in vivo*. Malgré que nous n'ayons pas pu déterminer si l'Obx potentialisait les effets de Cis *in vivo*, ces premiers résultats sont très encourageants.

Plusieurs études *in vivo* démontrent l'effet marqué de l'Obx sur l'inhibition de la progression tumorale. En effet, les souris xénotransplantées avec des cellules cancéreuses de la prostate et de l'ovaire montrent une progression tumorale significativement diminuée<sup>88</sup>. Dans les souris injectées orthotopiquement avec des cellules tumorales du cholangiocarcinome, l'Obx en monothérapie inhibe significativement la progression tumorale résultant en un poids total de la tumeur 10 fois inférieure au poids contrôle<sup>219</sup>. Cependant, des études de pharmacokinétique humaine démontrent que malgré des

injections bolus, la concentration d'Obx dans la tumeur atteint une concentration maximale de 10 à 80ng/mL ce qui est beaucoup moins que la concentration requise *in vitro* pour certaines tumeurs <sup>112</sup>. Ainsi, cela expliquerait pourquoi des études *in vivo* sur les myélomes multiples n'ont généré aucune régression tumorale significative <sup>113</sup>. Cependant, dans les thérapies combinées, Obx montrent un effet additif aux autres agents anticancéreux et par conséquent, une concentration moins élevée serait suffisante pour induire une régression tumorale <sup>113</sup>. Ainsi, plusieurs études d'Obx en combinaison à d'autres agents anticancéreux montrent une plus grande efficacité *in vivo* et garantissent un avenir prometteur <sup>113,148</sup>.



## Conclusion

Le NB est un cancer pédiatrique très fréquent chez l'enfant. Près de 40% des enfants ne survivront pas à la maladie même après des traitements agressifs. Il est donc primordial de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'augmenter la survie des patients atteints de NB à haut risque.

Suite à l'établissement de nos hypothèses et nos objectifs de travail, les résultats présentés dans ce mémoire démontrent qu'AG combiné à la Doxo ou au Cis ne semble pas être une thérapie envisageable dans le NB. En effet, plusieurs de nos résultats ont illustré l'absence de synergisme entre ces combinaisons. Cependant, nous avons démontré que les cellules de NB sont très sensibles au traitement d'Obx. Cet inhibiteur de Bcl-2 a d'ailleurs montré des effets anti-tumoral significatif *in vitro* et *in vivo*. Nous avons également confirmé le potentiel d'une éventuelle thérapie combiné avec le Cis. L'Obx, seul ou en combinaison avec d'autres agents anticancéreux, semble être une nouvelle avenue thérapeutique très encourageante.

Afin de complètement éliminer l'AG comme éventuelle thérapie dans le NB, il serait intéressant de faire des études *in vivo* avec des combinaison Doxo et Cis. De plus, il serait intéressant de confirmer si Obx a une action synergique avec d'autres agents anticancéreux classiquement utilisés dans le traitement du NB tels que la Doxo, le Topotécan ou la Vincristine.

## Bibliographie

1. Maris, J.M. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* **362**, 2202-11 (2010).
2. Zage, P.E., Louis, C.U. & Cohn, S.L. New aspects of neuroblastoma treatment: ASPHO 2011 symposium review. *Pediatr Blood Cancer* **58**, 1099-105 (2012).
3. Maris, J.M. The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. *Curr Opin Pediatr* **17**, 7-13 (2005).
4. Minoux, M. & Rijli, F.M. Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development* **137**, 2605-21 (2010).
5. Morales, A.V., Barbas, J.A. & Nieto, M.A. How to become neural crest: from segregation to delamination. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 655-62 (2005).
6. Gammill, L.S. & Bronner-Fraser, M. Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci* **4**, 795-805 (2003).
7. Joseph, N.M. *et al.* Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development* **131**, 5599-612 (2004).
8. Jessen, K.R. & Mirsky, R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* **6**, 671-82 (2005).
9. Motohashi, T. *et al.* Neural crest cells retain their capability for multipotential differentiation even after lineage-restricted stages. *Dev Dyn* (2011).
10. Gershon, T.R., Oppenheimer, O., Chin, S.S. & Gerald, W.L. Temporally regulated neural crest transcription factors distinguish neuroectodermal tumors of varying malignancy and differentiation. *Neoplasia* **7**, 575-84 (2005).
11. Netter, F.H. *Atlas d'anatomie humaine*, (Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA, 2007).
12. Ellison, L.F., De, P., Mery, L.S., Grundy, P.E. & Statistics, C.C.S.s.S.C.f.C.C. Canadian cancer statistics at a glance: cancer in children. *CMAJ* **180**, 422-4 (2009).
13. Kaatsch, P. Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat Rev* **36**, 277-85 (2010).
14. Heck, J.E., Ritz, B., Hung, R.J., Hashibe, M. & Boffetta, P. The epidemiology of neuroblastoma: a review. *Paediatr Perinat Epidemiol* **23**, 125-43 (2009).
15. Martinsson, T., Sjöberg, R.M., Hedborg, F. & Kogner, P. Homozygous deletion of the neurofibromatosis-1 gene in the tumor of a patient with neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* **95**, 183-9 (1997).
16. Miller, R.W. & Rubinstein, J.H. Tumors in Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet* **56**, 112-5 (1995).

17. Moore, S.W. The contribution of associated congenital anomalies in understanding Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* **22**, 305-15 (2006).
18. Yoon, G. *et al.* Neuroblastoma in a patient with the Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS). *Med Pediatr Oncol* **38**, 193-9 (2002).
19. George, R.E., Lipshultz, S.E., Lipsitz, S.R., Colan, S.D. & Diller, L. Association between congenital cardiovascular malformations and neuroblastoma. *J Pediatr* **144**, 444-8 (2004).
20. Sharp, S.E., Gelfand, M.J. & Shulkin, B.L. Pediatrics: diagnosis of neuroblastoma. *Semin Nucl Med* **41**, 345-53 (2011).
21. Matthay, K.K. *et al.* Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *J Clin Oncol* **27**, 1007-13 (2009).
22. Perez, C.A. *et al.* Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy: a children's cancer group study. *J Clin Oncol* **18**, 18-26 (2000).
23. Nickerson, H.J. *et al.* Favorable biology and outcome of stage IV-S neuroblastoma with supportive care or minimal therapy: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* **18**, 477-86 (2000).
24. Baker, D.L. *et al.* Outcome after reduced chemotherapy for intermediate-risk neuroblastoma. *N Engl J Med* **363**, 1313-23 (2010).
25. Weinstein, J.L., Katzenstein, H.M. & Cohn, S.L. Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *Oncologist* **8**, 278-92 (2003).
26. Perel, Y. *et al.* [Prognosis of neuroblastoma in childhood. Methods of assessment and clinical use]. *Arch Pediatr* **11**, 834-42 (2004).
27. Woods, W.G. *et al.* A population-based study of the usefulness of screening for neuroblastoma. *Lancet* **348**, 1682-7 (1996).
28. Hiyama, E. *et al.* Effectiveness of screening for neuroblastoma at 6 months of age: a retrospective population-based cohort study. *Lancet* **371**, 1173-80 (2008).
29. Pérel, Y. *et al.* [Prognosis of neuroblastoma in childhood. Methods of assessment and clinical use]. *Arch Pediatr* **11**, 834-42 (2004).
30. Brodeur, G.M. *et al.* Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* **11**, 1466-77 (1993).
31. Monclair, T. *et al.* The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* **27**, 298-303 (2009).
32. Colon, N.C. & Chung, D.H. Neuroblastoma. *Adv Pediatr* **58**, 297-311 (2011).

33. Lonergan, G.J., Schwab, C.M., Suarez, E.S. & Carlson, C.L. Neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and ganglioneuroma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics* **22**, 911-34 (2002).
34. Peuchmaur, M. *et al.* Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer* **98**, 2274-81 (2003).
35. Brodeur, G.M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* **3**, 203-16 (2003).
36. Shimada, H. *et al.* The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* **86**, 364-72 (1999).
37. Ho, R. *et al.* Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res* **62**, 6462-6 (2002).
38. Janoueix-Lerosey, I. *et al.* Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol* **27**, 1026-33 (2009).
39. Schwab, M. *et al.* Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* **305**, 245-8 (1983).
40. Bown, N. Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. *J Clin Pathol* **54**, 897-910 (2001).
41. Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E. & Bishop, J.M. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* **224**, 1121-4 (1984).
42. Brodeur, G.M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* **3**, 203-16 (2003).
43. Gilbert, F. *et al.* Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17. *Cancer Res* **44**, 5444-9 (1984).
44. Combaret, V. *et al.* Determination of 17q gain in patients with neuroblastoma by analysis of circulating DNA. *Pediatr Blood Cancer* **56**, 757-61 (2011).
45. Yong, M.H. *et al.* Comparing histopathological classification with MYCN, 1p36 and 17q status detected by fluorescence in situ hybridisation from 14 untreated primary neuroblastomas in Singapore. *Singapore Med J* **50**, 1090-4 (2009).
46. Franke, F., Rudolph, B., Christiansen, H., Harbott, J. & Lampert, F. Tumour karyotype may be important in the prognosis of human neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **111**, 266-72 (1986).
47. Fischer, M. *et al.* Integrated genomic profiling identifies two distinct molecular subtypes with divergent outcome in neuroblastoma with loss of chromosome 11q. *Oncogene* **29**, 865-75 (2010).

48. Brodeur, G.M., Sekhon, G. & Goldstein, M.N. Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer* **40**, 2256-63 (1977).
49. Cheung, N.V. & Heller, G. Chemotherapy dose intensity correlates strongly with response, median survival, and median progression-free survival in metastatic neuroblastoma. *J Clin Oncol* **9**, 1050-8 (1991).
50. Hara, J. Development of treatment strategies for advanced neuroblastoma. *Int J Clin Oncol* **17**, 196-203 (2012).
51. Shusterman, S. *et al.* Antitumor activity of hu14.18-IL2 in patients with relapsed/refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group (COG) phase II study. *J Clin Oncol* **28**, 4969-75 (2010).
52. Hu, W. *et al.* Frequent overexpression of STK15/Aurora-A/BTAK and chromosomal instability in tumorigenic cell cultures derived from human ovarian cancer. *Oncol Res* **15**, 49-57 (2005).
53. Maris, J.M. *et al.* Initial testing of the aurora kinase A inhibitor MLN8237 by the Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP). *Pediatr Blood Cancer* **55**, 26-34 (2010).
54. Hottiger, M.O., Hassa, P.O., Luscher, B., Schuler, H. & Koch-Nolte, F. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem Sci* **35**, 208-19 (2010).
55. Wang, Z., Wang, F., Tang, T. & Guo, C. The role of PARP1 in the DNA damage response and its application in tumor therapy. *Front Med* **6**, 156-64 (2012).
56. Langelier, M.F., Servent, K.M., Rogers, E.E. & Pascal, J.M. A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *J Biol Chem* **283**, 4105-14 (2008).
57. Tao, Z., Gao, P., Hoffman, D.W. & Liu, H.W. Domain C of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 is important for enzyme activity and contains a novel zinc-ribbon motif. *Biochemistry* **47**, 5804-13 (2008).
58. Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M.J., Kaufmann, S.H. & Poirier, G.G. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat Rev Cancer* **10**, 293-301 (2010).
59. Kim, M.Y., Zhang, T. & Kraus, W.L. Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: 'PAR-laying' NAD<sup>+</sup> into a nuclear signal. *Genes Dev* **19**, 1951-67 (2005).
60. A, M. & A, B.r. How to kill tumor cells with inhibitors of poly(ADP-ribosylation). *Int J Cancer* **128**, 251-265 (2011).
61. D'Amours, D., Sallmann, F.R., Dixit, V.M. & Poirier, G.G. Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci* **114**, 3771-8 (2001).

62. Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. & Poirier, G.G. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* **53**, 3976-85 (1993).
63. Sartelet, H. *et al.* High level of apoptosis and low AKT activation in mass screening as opposed to standard neuroblastoma. *Histopathology* **56**, 607-16 (2010).
64. Ciccia, A. & Elledge, S.J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* **40**, 179-204 (2010).
65. Caldecott, K.W. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet* **9**, 619-31 (2008).
66. Haince, J.F. *et al.* Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* **282**, 16441-53 (2007).
67. Citarelli, M., Teotia, S. & Lamb, R.S. Evolutionary history of the poly(ADP-ribose) polymerase gene family in eukaryotes. *BMC Evol Biol* **10**, 308 (2010).
68. Heitz, F. *et al.* Poly(ADP-ribosylation) polymerases: mechanism and new target of anticancer therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* **10**, 1125-36 (2010).
69. Bryant, H.E. *et al.* PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *EMBO J* **28**, 2601-15 (2009).
70. Ohashi, Y., Ueda, K., Hayaishi, O., Ikai, K. & Niwa, O. Induction of murine teratocarcinoma cell differentiation by suppression of poly(ADP-ribose) synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7132-6 (1984).
71. Kanai, M. *et al.* Involvement of poly (ADP-ribose) metabolism in induction of differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* **105**, 404-11 (1982).
72. Tsutsumi, M. *et al.* Increased susceptibility of poly(ADP-ribose) polymerase-1 knockout mice to nitrosamine carcinogenicity. *Carcinogenesis* **22**, 1-3 (2001).
73. Masutani, M., Nakagama, H. & Sugimura, T. Poly(ADP-ribosylation) in relation to cancer and autoimmune disease. *Cell Mol Life Sci* **62**, 769-83 (2005).
74. Bieche, I., de Murcia, G. & Lidereau, R. Poly(ADP-ribose) polymerase gene expression status and genomic instability in human breast cancer. *Clin Cancer Res* **2**, 1163-7 (1996).
75. Yuan, Y., Liao, Y.M., Hsueh, C.T. & Mirshahidi, H.R. Novel targeted therapeutics: inhibitors of MDM2, ALK and PARP. *J Hematol Oncol* **4**, 16 (2011).
76. Ratnam, K. & Low, J.A. Current development of clinical inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in oncology. *Clin Cancer Res* **13**, 1383-8 (2007).
77. Comen, E.A. & Robson, M. Inhibition of poly(ADP)-ribose polymerase as a therapeutic strategy for breast cancer. *Oncology (Williston Park)* **24**, 55-62 (2010).

78. Carden, C.P., Yap, T.A. & Kaye, S.B. PARP inhibition: targeting the Achilles' heel of DNA repair to treat germline and sporadic ovarian cancers. *Curr Opin Oncol* **22**, 473-80 (2010).
79. Plummer, R. *et al.* Phase I study of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* **14**, 7917-23 (2008).
80. Daniel, R.A. *et al.* Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 enhances temozolomide and topotecan activity against childhood neuroblastoma. *Clin Cancer Res* **15**, 1241-9 (2009).
81. McCluskey, A.G. *et al.* Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Enhances the Toxicity of <sup>131</sup>I-Metaiodobenzylguanidine/Topotecan Combination Therapy to Cells and Xenografts That Express the Noradrenaline Transporter. *J Nucl Med* **53**, 1146-54 (2012).
82. Korsmeyer, S.J. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* **80**, 879-86 (1992).
83. Zhou, F., Yang, Y. & Xing, D. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *FEBS J* **278**, 403-13 (2011).
84. Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C. & Croce, C.M. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* **226**, 1097-9 (1984).
85. Oltvai, Z.N., Milliman, C.L. & Korsmeyer, S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-19 (1993).
86. Yip, K.W. & Reed, J.C. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* **27**, 6398-406 (2008).
87. Kelly, P.N., Dakic, A., Adams, J.M., Nutt, S.L. & Strasser, A. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science* **317**, 337 (2007).
88. Bajwa, N., Liao, C. & Nikolovska-Coleska, Z. Inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* **22**, 37-55 (2012).
89. Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E. & Swanson, P.E. Cell death. *N Engl J Med* **361**, 1570-83 (2009).
90. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
91. Adams, J.M. & Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324-37 (2007).
92. Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E. & Reed, J.C. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **82**, 1820-8 (1993).

93. Kitada, S. *et al.* Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* **91**, 3379-89 (1998).
94. Robertson, L.E., Plunkett, W., McConnell, K., Keating, M.J. & McDonnell, T.J. Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia* **10**, 456-9 (1996).
95. Ikegaki, N., Katsumata, M., Minna, J. & Tsujimoto, Y. Expression of bcl-2 in small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res* **54**, 6-8 (1994).
96. Castle, V.P. *et al.* Expression of the apoptosis-suppressing protein bcl-2, in neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N-myc amplification. *Am J Pathol* **143**, 1543-50 (1993).
97. Rao, P.H. *et al.* Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **92**, 234-40 (1998).
98. Cimmino, A. *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13944-9 (2005).
99. Zhang, B., Gojo, I. & Fenton, R.G. Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma. *Blood* **99**, 1885-93 (2002).
100. Horita, M. *et al.* Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med* **191**, 977-84 (2000).
101. Beroukhi, R. *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **463**, 899-905 (2010).
102. Le Gouill, S. *et al.* VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. *Blood* **104**, 2886-92 (2004).
103. Kobayashi, S., Werneburg, N.W., Bronk, S.F., Kaufmann, S.H. & Gores, G.J. Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* **128**, 2054-65 (2005).
104. Dole, M. *et al.* Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Res* **54**, 3253-9 (1994).
105. Mejia, M.C., Navarro, S., Pellin, A., Castel, V. & Llombart-Bosch, A. Study of bcl-2 protein expression and the apoptosis phenomenon in neuroblastoma. *Anticancer Res* **18**, 801-6 (1998).
106. Nakagawara, A. *et al.* High levels of expression and nuclear localization of interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) and CPP32 in favorable human neuroblastomas. *Cancer Res* **57**, 4578-84 (1997).



107. Cotter, F.E. *et al.* Antisense oligonucleotides suppress B-cell lymphoma growth in a SCID-hu mouse model. *Oncogene* **9**, 3049-55 (1994).
108. Klasa, R.J., Gillum, A.M., Klem, R.E. & Frankel, S.R. Oblimersen Bcl-2 antisense: facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **12**, 193-213 (2002).
109. O'Brien, S.M. *et al.* Phase I to II multicenter study of oblimersen sodium, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* **23**, 7697-702 (2005).
110. Oltersdorf, T. *et al.* An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **435**, 677-81 (2005).
111. Chonghaile, T.N. & Letai, A. Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene* **27 Suppl 1**, S149-57 (2008).
112. Perez-Galan, P., Roue, G., Villamor, N., Campo, E. & Colomer, D. The BH3-mimetic GX15-070 synergizes with bortezomib in mantle cell lymphoma by enhancing Noxa-mediated activation of Bak. *Blood* **109**, 4441-9 (2007).
113. Trudel, S. *et al.* Preclinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma. *Blood* **109**, 5430-8 (2007).
114. Huang, S., Okumura, K. & Sinicrope, F.A. BH3 mimetic obatoclax enhances TRAIL-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* **15**, 150-9 (2009).
115. Witters, L.M. *et al.* Synergistic inhibition of breast cancer cell lines with a dual inhibitor of EGFR-HER-2/neu and a Bcl-2 inhibitor. *Oncol Rep* **17**, 465-9 (2007).
116. Schimmer, A.D. *et al.* A phase I study of the pan bcl-2 family inhibitor obatoclax mesylate in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* **14**, 8295-301 (2008).
117. Hwang, J.J. *et al.* Phase I dose finding studies of obatoclax (GX15-070), a small molecule pan-BCL-2 family antagonist, in patients with advanced solid tumors or lymphoma. *Clin Cancer Res* **16**, 4038-45 (2010).
118. Paik, P.K. *et al.* A phase I study of obatoclax mesylate, a Bcl-2 antagonist, plus topotecan in solid tumor malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* **66**, 1079-85 (2010).
119. Dick, J.E. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* **112**, 4793-807 (2008).
120. Dick, J.E. Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat Biotechnol* **27**, 44-6 (2009).
121. Lapidot, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645-8 (1994).

122. Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J. & Clarke, M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3983-8 (2003).
123. Subramaniam, D., Ramalingam, S., Houchen, C.W. & Anant, S. Cancer stem cells: a novel paradigm for cancer prevention and treatment. *Mini Rev Med Chem* **10**, 359-71 (2010).
124. Siapati, E.K., Rouka, E., Kyriakou, D. & Vassilopoulos, G. Neuroblastoma cells negative for CD44 possess tumor-initiating properties. *Cell Oncol (Dordr)* **34**, 189-97 (2011).
125. Landen, C.N., Jr. *et al.* Targeting aldehyde dehydrogenase cancer stem cells in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* **9**, 3186-99 (2010).
126. Singh, S.K. *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**, 5821-8 (2003).
127. Singh, S.K. *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396-401 (2004).
128. Zhang, H. & Li, S.Y. Research progression of CD133 as a marker of cancer stem cells. *Chin J Cancer* **29**, 243-7 (2010).
129. Cournoyer, S. *et al.* Genotype analysis of tumor-initiating cells expressing CD133 in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* **51**, 792-804 (2012).
130. Shervington, A. & Lu, C. Expression of multidrug resistance genes in normal and cancer stem cells. *Cancer Invest* **26**, 535-42 (2008).
131. Bao, S. *et al.* Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* **66**, 7843-8 (2006).
132. Phillips, T.M., McBride, W.H. & Pajonk, F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* **98**, 1777-85 (2006).
133. Dean, M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **14**, 3-9 (2009).
134. Moitra, K., Lou, H. & Dean, M. Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clin Pharmacol Ther* **89**, 491-502 (2011).
135. Liu, G. *et al.* Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* **5**, 67 (2006).
136. Yu, C.C. *et al.* Medulloblastoma-derived tumor stem-like cells acquired resistance to TRAIL-induced apoptosis and radiosensitivity. *Childs Nerv Syst* **26**, 897-904 (2010).
137. Xu, X.L. *et al.* The properties of tumor-initiating cells from a hepatocellular carcinoma patient's primary and recurrent tumor. *Carcinogenesis* **31**, 167-74 (2010).

138. Shimo, T. *et al.* Antitumor and anticancer stem cell activity of a poly ADP-ribose polymerase inhibitor olaparib in breast cancer cells. *Breast Cancer* (2012).
139. Saulnier Sholler, G.L. *et al.* Nifurtimox induces apoptosis of neuroblastoma cells in vitro and in vivo. *J Pediatr Hematol Oncol* **31**, 187-93 (2009).
140. Hanada, M. *et al.* Regulation of Bcl-2 oncoprotein levels with differentiation of human neuroblastoma cells. *Cancer Res* **53**, 4978-86 (1993).
141. Dole, M.G. *et al.* Bcl-xL is expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* **55**, 2576-82 (1995).
142. Reed, J.C. *et al.* Differential expression of bcl2 protooncogene in neuroblastoma and other human tumor cell lines of neural origin. *Cancer Res* **51**, 6529-38 (1991).
143. Hoehner, J.C., Hedborg, F., Wiklund, H.J., Olsen, L. & Pahlman, S. Cellular death in neuroblastoma: in situ correlation of apoptosis and bcl-2 expression. *Int J Cancer* **62**, 19-24 (1995).
144. Ramani, P. & Lu, Q.L. Expression of bcl-2 gene product in neuroblastoma. *J Pathol* **172**, 273-8 (1994).
145. Ikegaki, N., Katsumata, M., Tsujimoto, Y., Nakagawara, A. & Brodeur, G.M. Relationship between bcl-2 and myc gene expression in human neuroblastoma. *Cancer Lett* **91**, 161-8 (1995).
146. Tonini, G.P. *et al.* Evidence of apoptosis in neuroblastoma at onset and relapse. An analysis of a large series of tumors. *J Neurooncol* **31**, 209-15 (1997).
147. Brodeur, G.M. *et al.* International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* **6**, 1874-81 (1988).
148. Samuel, S. *et al.* VSV oncolysis in combination with the BCL-2 inhibitor obatoclax overcomes apoptosis resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Ther* **18**, 2094-103 (2010).
149. Sartelet, H., Durrieu, L., Fontaine, F., Nyalendo, C. & Haddad, E. Description of a New Xenograft Model of Metastatic Neuroblastoma Using NOD/SCID/Il2rg Null (NSG) Mice. *In Vivo* **26**, 19-29 (2012).
150. Bonner, W.M. *et al.* GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 957-67 (2008).
151. Szanto, A. *et al.* PARP-1 inhibition-induced activation of PI-3-kinase-Akt pathway promotes resistance to taxol. *Biochem Pharmacol* **77**, 1348-57 (2009).
152. Ethier, C., Labelle, Y. & Poirier, G.G. PARP-1-induced cell death through inhibition of the MEK/ERK pathway in MNNG-treated HeLa cells. *Apoptosis* **12**, 2037-49 (2007).
153. Adams, G.A. *et al.* Thoracic neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Pediatr Surg* **28**, 372-7; discussion 377-8 (1993).

154. Farmer, H. *et al.* Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**, 917-21 (2005).
155. Basu, B., Yap, T.A., Molife, L.R. & de Bono, J.S. Targeting the DNA damage response in oncology: past, present and future perspectives. *Curr Opin Oncol* **24**, 316-24 (2012).
156. Domagala, P., Huzarski, T., Lubinski, J., Gugala, K. & Domagala, W. Immunophenotypic predictive profiling of BRCA1-associated breast cancer. *Virchows Arch* **458**, 55-64 (2011).
157. De Vos, M., Schreiber, V. & Dantzer, F. The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem Pharmacol* **84**, 137-46 (2012).
158. Barnett, J.C. *et al.* High poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression and poor survival in advanced-stage serous ovarian cancer. *Obstet Gynecol* **115**, 49-54 (2010).
159. Klauschen, F. *et al.* High nuclear poly-(ADP-ribose)-polymerase expression is prognostic of improved survival in pancreatic cancer. *Histopathology* (2012).
160. Csete, B., Lengyel, Z., Kadar, Z. & Battyani, Z. Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase-1 expression in cutaneous malignant melanomas as a new molecular marker of aggressive tumor. *Pathol Oncol Res* **15**, 47-53 (2009).
161. Galia, A. *et al.* PARP-1 protein expression in glioblastoma multiforme. *Eur J Histochem* **56**, e9 (2012).
162. Sulzyc-Bielicka, V. *et al.* Colorectal cancers differ in respect of PARP-1 protein expression. *Pol J Pathol* **63**, 87-92 (2012).
163. Domagala, P., Lubinski, J. & Domagala, W. Iniparib in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* **364**, 1780; author reply 1781 (2011).
164. Ossovskaya, V., Koo, I.C., Kaldjian, E.P., Alvares, C. & Sherman, B.M. Upregulation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types. *Genes Cancer* **1**, 812-21 (2010).
165. Piskunova, T.S. *et al.* Deficiency in Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Accelerates Aging and Spontaneous Carcinogenesis in Mice. *Curr Gerontol Geriatr Res*, 754190 (2008).
166. Krzysztof, P., Marta, M. & Gérard, K. PARP-1 activity in normal and cancerous human endometrium and its relationship with quantity of abasic sites (AP). *ginekologia Polska* **82**, 16-21 (2011).

167. Tong, W.M., Cortes, U. & Wang, Z.Q. Poly(ADP-ribose) polymerase: a guardian angel protecting the genome and suppressing tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* **1552**, 27-37 (2001).
168. Domagala, P., Huzarski, T., Lubinski, J., Gugala, K. & Domagala, W. PARP-1 expression in breast cancer including BRCA1-associated, triple negative and basal-like tumors: possible implications for PARP-1 inhibitor therapy. *Breast Cancer Res Treat* **127**, 861-9 (2011).
169. Shimizu, S. *et al.* Expression of poly(ADP-ribose) polymerase in human hepatocellular carcinoma and analysis of biopsy specimens obtained under sonographic guidance. *Oncol Rep* **12**, 821-5 (2004).
170. Zhang, Y.W. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase and XPF-ERCC1 participate in distinct pathways for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **39**, 3607-20 (2011).
171. Mascolo, M. *et al.* Overexpression of chromatin assembly factor-1 p60, poly(ADP-ribose) polymerase 1 and nestin predicts metastasizing behaviour of oral cancer. *Histopathology* (2012).
172. Tentori, L. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibition or PARP-1 gene deletion reduces angiogenesis. *Eur J Cancer* **43**, 2124-33 (2007).
173. Tentori, L. *et al.* Stable depletion of poly (ADP-ribose) polymerase-1 reduces in vivo melanoma growth and increases chemosensitivity. *Eur J Cancer* **44**, 1302-14 (2008).
174. Li, M., Threadgill, M.D., Wang, Y., Cai, L. & Lin, X. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition down-regulates expression of metastasis-related genes in CT26 colon carcinoma cells. *Pathobiology* **76**, 108-16 (2009).
175. Staibano, S. *et al.* Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase 1 expression in malignant melanomas from photoexposed areas of the head and neck region. *Hum Pathol* **36**, 724-31 (2005).
176. Thomas, H.D. *et al.* Preclinical selection of a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor for clinical trial. *Mol Cancer Ther* **6**, 945-56 (2007).
177. Calabrese, C.R. *et al.* Identification of potent nontoxic poly(ADP-Ribose) polymerase-1 inhibitors: chemopotential and pharmacological studies. *Clin Cancer Res* **9**, 2711-8 (2003).
178. Javle, M. & Curtin, N.J. The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation. *Br J Cancer* **105**, 1114-22 (2011).
179. Bowman, K.J., Newell, D.R., Calvert, A.H. & Curtin, N.J. Differential effects of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor NU1025 on topoisomerase I and II inhibitor cytotoxicity in L1210 cells in vitro. *Br J Cancer* **84**, 106-12 (2001).

180. Tentori, L. & Graziani, G. Chemopotential by PARP inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Res* **52**, 25-33 (2005).
181. Weil, M.K. & Chen, A.P. PARP inhibitor treatment in ovarian and breast cancer. *Curr Probl Cancer* **35**, 7-50 (2011).
182. Huehls, A.M., Wagner, J.M., Huntoon, C.J. & Karnitz, L.M. Identification of DNA Repair Pathways that Affect the Survival of Ovarian Cancer Cells Treated with a PARP Inhibitor in a Novel Drug Combination. *Mol Pharmacol* (2012).
183. Ali, M. *et al.* The clinically active PARP inhibitor AG014699 ameliorates cardiotoxicity but does not enhance the efficacy of doxorubicin, despite improving tumor perfusion and radiation response in mice. *Mol Cancer Ther* **10**, 2320-9 (2011).
184. Munoz-Gamez, J.A. *et al.* Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase-1 enhances doxorubicin activity against liver cancer cells. *Cancer Lett* **301**, 47-56 (2011).
185. Munoz-Gamez, J.A. *et al.* PARP inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. *Biochem J* **386**, 119-25 (2005).
186. Curtin, N.J. *et al.* Novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, AG14361, restores sensitivity to temozolomide in mismatch repair-deficient cells. *Clin Cancer Res* **10**, 881-9 (2004).
187. Kubo, S. *et al.* Participation of poly(ADP-ribose) polymerase in the drug sensitivity in human lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* **118**, 244-8 (1992).
188. Wagner, J.M. & Karnitz, L.M. Cisplatin-induced DNA damage activates replication checkpoint signaling components that differentially affect tumor cell survival. *Mol Pharmacol* **76**, 208-14 (2009).
189. Dronkert, M.L. & Kanaar, R. Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res* **486**, 217-47 (2001).
190. Evers, B. *et al.* Selective inhibition of BRCA2-deficient mammary tumor cell growth by AZD2281 and cisplatin. *Clin Cancer Res* **14**, 3916-25 (2008).
191. Huang, S.H. *et al.* PJ34, an inhibitor of PARP-1, suppresses cell growth and enhances the suppressive effects of cisplatin in liver cancer cells. *Oncol Rep* **20**, 567-72 (2008).
192. Donawho, C.K. *et al.* ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. *Clin Cancer Res* **13**, 2728-37 (2007).
193. Vivanco, I. & Sawyers, C.L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 489-501 (2002).
194. Wong, K.K., Engelman, J.A. & Cantley, L.C. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* **20**, 87-90 (2010).

195. McCubrey, J.A. *et al.* Alteration of Akt activity increases chemotherapeutic drug and hormonal resistance in breast cancer yet confers an achilles heel by sensitization to targeted therapy. *Adv Enzyme Regul* **48**, 113-35 (2008).
196. Clark, A.S., West, K., Streicher, S. & Dennis, P.A. Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* **1**, 707-17 (2002).
197. Imajo, M., Tsuchiya, Y. & Nishida, E. Regulatory mechanisms and functions of MAP kinase signaling pathways. *IUBMB Life* **58**, 312-7 (2006).
198. Bonni, A. *et al.* Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* **286**, 1358-62 (1999).
199. McCubrey, J.A. *et al.* Involvement of p53 and Raf/MEK/ERK pathways in hematopoietic drug resistance. *Leukemia* **22**, 2080-90 (2008).
200. Abrams, S.L. *et al.* The Raf/MEK/ERK pathway can govern drug resistance, apoptosis and sensitivity to targeted therapy. *Cell Cycle* **9**, 1781-91 (2010).
201. Goldsmith, K.C. *et al.* BH3 response profiles from neuroblastoma mitochondria predict activity of small molecule Bcl-2 family antagonists. *Cell Death Differ* **17**, 872-82 (2010).
202. Lamers, F. *et al.* Targeted BCL2 inhibition effectively inhibits neuroblastoma tumour growth. *Eur J Cancer* (2012).
203. Zhai, D., Jin, C., Satterthwait, A.C. & Reed, J.C. Comparison of chemical inhibitors of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cell Death Differ* **13**, 1419-21 (2006).
204. Joudeh, J. & Claxton, D. Obatoclax mesylate : pharmacology and potential for therapy of hematological neoplasms. *Expert Opin Investig Drugs* **21**, 363-73 (2012).
205. Shoemaker, A.R. *et al.* A small-molecule inhibitor of Bcl-XL potentiates the activity of cytotoxic drugs in vitro and in vivo. *Cancer Res* **66**, 8731-9 (2006).
206. Tse, C. *et al.* ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* **68**, 3421-8 (2008).
207. Lock, R. *et al.* Initial testing (stage 1) of the BH3 mimetic ABT-263 by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer* **50**, 1181-9 (2008).
208. Vogler, M., Dinsdale, D., Dyer, M.J. & Cohen, G.M. Bcl-2 inhibitors: small molecules with a big impact on cancer therapy. *Cell Death Differ* **16**, 360-7 (2009).
209. Konopleva, M. *et al.* Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **10**, 375-88 (2006).
210. Deng, J. *et al.* BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell* **12**, 171-85 (2007).

211. Perez-Galan, P. *et al.* BCL-2 phosphorylation modulates sensitivity to the BH3 mimetic GX15-070 (Obatoclox) and reduces its synergistic interaction with bortezomib in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* **22**, 1712-20 (2008).
212. Konopleva, M. *et al.* Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (obatoclox). *Cancer Res* **68**, 3413-20 (2008).
213. Castedo, M. *et al.* Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **23**, 2825-37 (2004).
214. Frenzel, A., Grespi, F., Chmielewski, W. & Villunger, A. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis* **14**, 584-96 (2009).
215. Crawford, N. *et al.* Platinum resistant cancer cells conserve sensitivity to BH3 domains and obatoclox induced mitochondrial apoptosis. *Apoptosis* **16**, 311-20 (2011).
216. Brem, E.A. *et al.* Distinct cellular and therapeutic effects of obatoclox in rituximab-sensitive and -resistant lymphomas. *Br J Haematol* **153**, 599-611 (2011).
217. High, L.M. *et al.* The Bcl-2 homology domain 3 mimetic ABT-737 targets the apoptotic machinery in acute lymphoblastic leukemia resulting in synergistic in vitro and in vivo interactions with established drugs. *Mol Pharmacol* **77**, 483-94 (2010).
218. Ackler, S. *et al.* The Bcl-2 inhibitor ABT-263 enhances the response of multiple chemotherapeutic regimens in hematologic tumors in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* **66**, 869-80 (2010).
219. Smoot, R.L. *et al.* A Bax-mediated mechanism for obatoclox-induced apoptosis of cholangiocarcinoma cells. *Cancer Res* **70**, 1960-9 (2010).
220. Pan, J. *et al.* The BH3-mimetic GX15-070 induces autophagy, potentiates the cytotoxicity of carboplatin and 5-fluorouracil in esophageal carcinoma cells. *Cancer Lett* **293**, 167-74 (2010).
221. Chen, Z.J. *et al.* [Bcl-2 inhibitor ABT-737 enhances the cisplatin-induced apoptosis in breast cancer T47D cells]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **33**, 891-5 (2011).
222. Vogler, M. *et al.* Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors. *Cell Death Differ* **16**, 1030-9 (2009).
223. Bonapace, L. *et al.* Induction of autophagy-dependent necroptosis is required for childhood acute lymphoblastic leukemia cells to overcome glucocorticoid resistance. *J Clin Invest* **120**, 1310-23 (2010).
224. Martin, A.P. *et al.* Inhibition of MCL-1 enhances lapatinib toxicity and overcomes lapatinib resistance via BAK-dependent autophagy. *Cancer Biol Ther* **8**, 2084-96 (2009).



225. Martin, A.P. *et al.* BCL-2 family inhibitors enhance histone deacetylase inhibitor and sorafenib lethality via autophagy and overcome blockade of the extrinsic pathway to facilitate killing. *Mol Pharmacol* **76**, 327-41 (2009).
226. Maiuri, M.C. *et al.* BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* **3**, 374-6 (2007).
227. Levine, B., Sinha, S. & Kroemer, G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* **4**, 600-6 (2008).
228. Pattingre, S. & Levine, B. Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Res* **66**, 2885-8 (2006).
229. Shimizu, S. *et al.* Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* **6**, 1221-8 (2004).
230. Hippert, M.M., O'Toole, P.S. & Thorburn, A. Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Res* **66**, 9349-51 (2006).

