

ANNÉE 2013

N°

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
par
Julien Fleurence

Présentée et soutenue publiquement le 17 mai 2013

Le neuroblastome :
Innovations diagnostiques et thérapeutiques

Président : Mr Yves-François Pouchus, Professeur de Mycologie et de Botanique

Membres du Jury : Mr Stéphane Birklé, Maître de conférences en Immunologie

Mme Françoise Nazih, Maître de conférences en Biochimie

Mme Estelle Thébaud, Docteur en hématologie-oncologie pédiatrique

Remerciements

Je tiens, tout d'abord, à remercier l'ensemble de mon jury qui me fait l'honneur d'évaluer ce travail de thèse.

Je remercie le Pr. Yves-François Pouchus d'avoir accepté la présidence de ce jury. Je le remercie également, ainsi que le Dr Nicolas Ruiz, pour m'avoir accueilli dans leur équipe au sein du groupe de recherche Molécules Mer Santé (MMS), lors de mon stage d'initiation à la recherche. C'était alors ma première expérience dans le monde de la recherche et je vous remercie pour l'accueil que vous m'avez réservé, j'en ai gardé un très bon souvenir.

Je tiens à remercier tout particulièrement Stéphane Birklé pour avoir dirigé mes travaux de thèse et pour l'ensemble de ses conseils. Je souhaite également vous remercier pour avoir encadré mes travaux, sur le " Le Globotriaosyl céramide, un marqueur potentiel de l'angiogénèse tumorale ", lors de mon stage industriel de 5^{ème} année de pharmacie au sein de l'équipe 14 de l'unité Inserm 892 au Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes-Angers (CRCNA). Le sujet de ma thèse s'inscrit dans la suite de ce stage industriel, où seront particulièrement décrites les approches immunologiques et la thérapie anti-angiogénique du neuroblastome. J'en garde un très bon souvenir et j'aimerais en profiter pour remercier l'ensemble de l'équipe 14 et plus particulièrement M. Tanguy Chaumette et Mlle. Elise Benneteau. C'est en effet durant vos cours de deuxième année que j'ai commencé à m'intéresser à l'immunologie. La complexité de ce système et les interactions entre les différents effecteurs dans diverses pathologies constitue aujourd'hui mon envie de persévérer dans cette voie professionnelle qu'est la recherche. C'est pour cette raison que je tiens à vous remercier pour la qualité de vos enseignements et de m'avoir fait découvrir cette discipline. Je remercie également Mylène Dorvillus et Mickaël Terme d'ATLAB pharma pour leurs conseils.

Je souhaite remercier le Docteur Estelle Thébaud, oncopédiatre au CHU de Nantes, pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je remercie également le Docteur Françoise Nazih qui me fait l'honneur d'être présente dans la composition de mon jury de thèse. En effet Mme Nazih m'a aidé, conseillé et encouragé à devenir tuteur, une expérience enrichissante qui m'a particulièrement intéressé.

Je tiens à remercier le Dr Elise Verron pour son encadrement lors du projet industriel sur les études toxicologiques non cliniques du diclofénac lors de la 5^{ème} année industrie de pharmacie, à la faculté de Nantes. Je la remercie également pour l'ensemble de ces conseils et sa disponibilité.

Je remercie également le Professeur Christine Herrecknecht et le Professeur Jacques Aubry pour leur disponibilité et leurs conseils.

Je tiens à remercier l'ensemble des enseignants qui ont encadré mes stages de recherche et mes stages hospitalo-universitaires : Monsieur Yves-François Pouchus, Monsieur Nicolas Ruiz, Monsieur Stéphane Birklé, Mademoiselle Elise Verron, Monsieur Sébastien Schmitt, Monsieur Sébastien Küry, Monsieur Julien Nizard, Madame Edwige De Chauvigny, Herr Wilfried Büchler, Frau Elke Wagenbauer. D'autre part je remercie ma maître de stage en officine Madame Briffaud, qui m'a permis de faire l'ensemble de mes stages officinaux dans sa pharmacie, ainsi que l'équipe officinale et plus particulièrement Madame Vanessa Martin et Monsieur Julien Olive.

Je souhaite remercier également des enseignants qui m'ont marqué lors de mes études secondaires. Je remercie Monsieur Jean-Max Angélini, Monsieur Blanchard, Monsieur Grau et Madame Courtial pour la qualité de leur enseignement, mais aussi pour leur aide et leur simplicité.

Je remercie l'ensemble de l'équipe de football de santé de Nantes, ainsi que l'équipe universitaire de course à pied de Nantes pour l'ensemble des moments passés et les expériences partagées.

Je tiens à remercier mon ancien groupe de tutorés : Vincent, Julie, Emeline, Shira, Coralie, Marc, Luciano et leur souhaite tous mes vœux de réussite dans leurs études pharmaceutiques.

Je remercie mes deux parrains Vincent le Fol et Emeric Belliot, mon ancien tuteur Jonathan Landré et Aurélie Pouchus pour leur soutien et les moments agréables que nous avons passés.

Un remerciement pour l'ensemble des étudiants que j'ai rencontré en pharmacie et particulièrement dans la promotion 2013, notamment Capuccine , Gaëtan , Pauline, Nadège, Marie, Clotide, Clémence, Sophie, Pierre, Audrey et plus spécialement Thomas Leclair avec qui j'ai partagé de bons moments depuis la première année de pharmacie. Je remercie également ma binôme Amélie pour l'ensemble de nos œuvres en travaux pratiques.

Je tiens à remercier chaleureusement mes amis d'enfance, Morgane, Yoann, Thomas, Guillaume, Audrey, Gaëlle, Nolwenn, Emilie, Laetitia, Fanny, Anthony, Sandra, Sandrine, Ugo et Quentin. Cette thèse marque la fin de mes études pharmaceutiques et de ma vie étudiante. Je voulais vous remercier pour tous les moments vécus ensemble, pour votre soutien dans les moments difficiles et pour l'ensemble des soirées que nous avons faites.

Enfin je tiens à remercier l'ensemble de ma famille. Merci à mon petit frère Simon pour son soutien, sa bonne humeur et pour tous les moments partagés. Je tiens à remercier également la compagne de mon père Mademoiselle Sylvie Hurel récemment décédée d'un cancer du sein, pour sa bonne humeur, son aide et sa gentillesse. Merci également à mes grands-parents pour leur soutien et particulièrement à Jacques, qui aurait aimé partager ce moment. Je tiens également à remercier mes parents Fabienne Saint-Marty et Joël Fleurence, qui m'ont soutenu dans tous les moments difficiles et qui ont donné le maximum pour qu'avec Simon, nous réussissions dans notre vie que ça soit au niveau professionnel ou personnel. Je ne vous remercierai jamais assez pour tous les efforts que vous avez faits pour nous deux.

Table des Matières

Liste des Figures	11
Liste des Tableaux	13
Liste des abréviations.....	14
Introduction générale	21

Première Partie. De la pathologie aux nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques..... 24

I- Le neuroblastome	25
1- Définition.....	26
2- Épidémiologie.....	26
2-1- Prévalence	27
2-2- Incidence.....	27
2-3- Étiologie	28
2-4- La mortalité	29
3- Classifications du neuroblastome	29
3-1- Système international de classement du neuroblastome (International Neuroblastoma Staging System)	29
3-2- La classification internationale de la pathologie du neuroblastome (International Neuroblastoma Pathology Classification)	30
3-3- Le groupe de risque international du neuroblastome (International Neuroblastoma Risk Group).....	32
3-4- Le Groupe d'Oncologie Pédiatrique (The Children's Oncology Group) (Monrovia, Californie, USA).....	33
4- Les manifestations cliniques.....	33
4-1- Les symptômes liés à la tumeur	33
4-2- Les symptômes liés aux métastases.....	34
4-3- Le neuroblastome en sablier	34

4-4-	Les syndrômes associés	34
4-4-1-	Le syndrome de Pepper.....	34
4-4-2-	Le syndrome de Kerner-Morrison	35
4-4-3-	Le syndrome d’Horner.....	35
5-	Les examens complémentaires	36
5-1-	Dosage des métabolites urinaires	36
5-2-	Bilan loco-régional par imagerie médicale	37
5-2-1-	L’échographie abdominale	37
5-2-2-	Le scanner	37
5-2-3-	L’Imagerie par Résonance Magnétique	38
5-2-4-	La radiographie	38
5-3-	Bilan d’extension métastatique.....	38
6-	Les facteurs pronostiques.....	40
6-1-	Le stade d’extension.....	40
6-2-	L’âge.....	40
6-3-	Les marqueurs sériques.....	40
6-4-	Les marqueurs génétiques et moléculaires	41
6-4-1-	L’oncogène MYCN.....	41
6-4-2-	La ploïdie de la cellule tumorale.....	42
6-4-3-	Les anomalies cytogénétiques clonales.....	42
6-4-5-	Neurotrophines et récepteurs	43
7-	Les thérapies actuelles dans le neuroblastome.....	43
7-1-	La chirurgie	44
7-2-	La chimiothérapie	45
7-3-	La greffe de cellules souches hématopoïétiques	45
7-4-	La radiothérapie	46
7-5-	Les indications thérapeutiques	47

8- La prise en charge de l'enfant en oncologie pédiatrique	48
8-1- Particularités et difficultés diagnostiques d'une tumeur chez l'enfant	48
8-2- L'annonce du diagnostic	48
8-3- Le traitement de l'hôpital au domicile du patient.....	48
8-4- Le rôle du psychologue pour une prise en charge globale.....	49
8-5- Prise en charge palliative dans le neuroblastome.....	49
9- Les associations de patients	49
9-1- L'association Hubert Guoin	49
9-2- L'association les Bagouz à Manon	50
9-3- L'association la Hulotte	50
9-4- La fédération Enfants et Santé	50
9-5- L'étoile de Martin	51

II- Les nouveaux marqueurs et les cibles thérapeutiques émergentes dans le neuroblastome52

1- Les nouveaux marqueurs.....	53
1-1- Les marqueurs épigénétiques	53
1-1-1- Rôle biologique de l'épigénétique.....	53
1-1-2- Epigénétique et cancer	54
1-1-3- Le récepteur nucléaire se liant au domaine 1 de la protéine SET	55
1-1-4- La protéine 2 liant un méthyl au CpG.....	55
1-1-5- L'histone H3 triméthylée sur la lysine 4 et 27	56
1-2- Les marqueurs moléculaires.....	57
1-2-1- Les variants alléliques du gène du facteur de transcription activateur 1 de la calmoduline.....	57
1-2-2- Le polymorphe c.1810C>T du gène au récepteur tyrosine kinase de la neutrophine	58
1-2-3- Les micro-ARN miR-487b et miR-410	58

1-2-4-	Le facteur de transcription jumelé à l'homéoboîte 2b et à la protéine homologue Msh de l'homéoboîte	59
1-2-5-	Le facteur de transcription de la boîte Y de liaison à la protéine 1	60
1-2-6-	La protéine de l'homéoboîte Hox-C9	61
1-2-7-	La protéine sécrétoire neuro-endocrine 55	61
2-	Les cibles thérapeutiques émergentes.....	62
2-1-	Les cibles moléculaires	62
2-1-1-	Le gène de la Doublecortine Like-Kinase.....	62
2-1-2-	Les micro-ARN	63
2-2-	Les cibles protéiques	64
2-2-1-	Le récepteur à la tyrosine kinase du lymphome anaplasique	64
2-2-2-	L'oncoprotéine Double minute 2 Souris.....	65
2-2-3-	La protéine kinase Polo-1	66
2-2-4-	La protéine sauvage p53 induite par le gene 1	67
2-2-5-	Le neuropeptide Y et son récepteur NY2R	68
2-2-6-	La protéine cathepsine L	69
2-2-7-	L'endosialine.....	69
2-2-8-	Les récepteurs à la neutrophine.....	70
2-2-9-	La protéine Notch-1.....	71
2-3-	Les marqueurs gangliosidiques GD2 et GD2-O-acétylé.....	72
2-3-1-	Le disialoganglioside GD2	72
2-3-2-	Le GD2-O-acétylé.....	73
III-	Les nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques	74
1-	Les innovations diagnostiques	75
1-1-	L'imagerie médicale : la tomographie par émission de positons au Fluorine-18-L-dihydroxyphenylalanine- tomographie par ordinateur	75
1-2-	L'analyse génétique	76

1-2-1-	Les polymorphismes nucléotidiques sur une seule base et les puces à ADN.....	76
1-2-2-	La technique de Fluorescence par Hybridation.....	77
1-2-3-	Visualisation et quantification du mi-RNA 124 dans les cellules de neuroblastome par couplage de la cytométrie de flux avec les sondes à ARN	79
1-2-4-	Détection de la maladie résiduelle par RT-PCR.....	79
2-	Les thérapies innovantes	80
2-1-	Les radiopharmaceutiques : le ¹³¹ I-metaiodobenzylguanidine	80
2-2-	Anticorps thérapeutique: l'anticorps monoclonal ch14.18 associé au facteur stimulant les colonies de granulocytes et des macrophages, l'Interleukine 2 et l'isotrétinoïne.....	81
2-3-	Les protocoles de combinaison de chimiothérapie associé à la chirurgie, l'immunothérapie et la transplantation de cellules souches.....	82
2-3-1-	Les combinaisons de chimiothérapie associée la chirurgie avec ou sans l'isotrétinoïne dans le traitement des jeunes atteints de neuroblastome.....	82
2-3-2	La transplantation de cellules souches associé à l'immunothérapie et à l'isotrétinoïne dans le traitement du neuroblastome	82
2-4-	L'angiogénèse.....	83
2-4-1.	L'angiogénèse tumorale	83
2-4-2.	L'angiogénèse et sa régulation dans le neuroblastome	84

Deuxième Partie. Stratégie anti-angiogénique et nouvelle cible thérapeutique : le globoside Gb3 88

1-	Les stratégies anti-angiogéniques	89
1-1-	Les anti-angiogéniques sur le marché.....	89
1-2-	Les anti-angiogéniques en développement clinique.....	90
1-3-	Les limites des molécules à activité biologique.....	91
2-	Le Globoside Gb3	92
2-1-	Structure.....	92
2-2-	Métabolisme du Gb3	93
2-2-1-	Voie de biosynthèse du Gb3	93

2-2-2- Implication du Gb3 dans les maladies métaboliques	93
2-3- Distribution du Gb3	94
2-3-1- Distribution tissulaire.....	94
2-3-2- Distribution cellulaire	94
2-4- Fonctions biologiques du Gb3	95
3- Les travaux du laboratoire avant mon arrivée	95
4- Etudes des propriétés de modulation de la signalisation cellulaire du 3E2	96
4-1- Matériels et méthodes	96
4-1-1- Lignées cellulaires.....	96
4-1-1-1- Les cellules endothéliales HMEC-1.....	96
4-1-1-2- La lignée tumorale Raji.....	96
4-1-1-3- L'hybridome 3E2	96
4-1-1-4- Test de viabilité cellulaire.....	97
4-1-2- Purification de l'anticorps monoclonal 3E2 par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine L	97
4-1-3- Analyse SDS-PAGE en conditions dénaturantes et réductrices de l'anticorps 3E2....	98
4-1-4- Test immunoenzymatique ELISA indirect sur les cellules disséquées	98
4-1-4-1- Préparations des plaques ELISA	98
4-1-4-2- Réalisation de l'ELISA	98
4-1-5- Analyse SDS-PAGE en conditions dénaturantes et réductrices des protéines cytoplasmiques de HMEC-1	99
4-1-6- Immunoempreinte	100
4-2- Résultats	101
4-2-1- Production du surnageant de culture de l'hybridome 3E2	101
4-2-2- Purification de l'anticorps monoclonal 3E2 par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine L	102
4-2-3- Analyse SDS-PAGE de l'anticorps monoclonal 3E2 purifié	102
4-2-4- Activité de l'anticorps monoclonal 3E2 purifié par méthode ELISA	103
4-2-5- Voies de signalisations impliquées dans l'effet cytostatique du 3E2	104

4-2-5-1- Voie de signalisation Erk	104
4-5-2- 2- Voie de signalisation Akt ou protéine kinase B.....	105
4-3- Discussion	106
Bibliographie	110
Annexes	138

Liste des Figures

Figure 1 : Localisations tumorales rencontrées dans le Neuroblastome	26
Figure 2. Métabolisme des cathécolamines.....	36
Figure 3 : Les stades d'extension loco-régionnales observables avec le scanner.....	37
Figure 4 : Scintigraphie MIBG à l'iode 131 utilisé chez un enfant atteint de neuroblastome.	39
Figure 5. Modèles de modifications des histones dans la cellule saine et tumorale.	56
Figure 6. Inhibition de la voie de signalisation Wnt par le facteur de transcription MSX1	60
Figure 7. Structure de la protéine ALK et mutations retrouvées dans le neuroblastome.	65
Figure 8. Contrôle de la voie de signalisation p 14 ^{ARF} /MDM2/p53	66
Figure 9. Activation du récepteur Trk A par son ligand NGF	70
Figure 10. Diverses réponses cellulaires liées à l'activation de la voie de signalisation Notch	72
Figure 11. Méthode de préparation des puces à ADN.....	77
Figure 12. Structure chimique de la norépinéphrine et de la métaiodobenzylguanidine	80
Figure 13. La néo-angiogénèse	84
Figure 14. Structure chimique du récepteur Gb3	92
Figure 15. Courbe de croissance de la lignée cellulaire 3E2 exprimée en nombre de cellules par ml en fonction du temps.	101
Figure 16. Profil d'élution de l'anticorps 3E2 par chromatographie d'affinité sur protéine L par mesure de l'absorbance à $\lambda = 280$ nm des différentes fractions collectées.....	102
Figure 17. Analyse électrophorétique SDS-PAGE de l'anticorps monoclonal 3E2 purifié en conditions dénaturantes et réductrices avec un gel de polyacrylamide 12%.	103
Figure 18. Etude de la spécificité de l'anticorps monoclonal 3E2 révélé par du GAM-HRP par test immunoenzymatique ELISA sur cellules dessiquées Raji.	103
Figure 19. Niveau d'expression des protéines p-Erk et Erk totale en fonction du temps d'incubation des cellules HMEC-1 en présence de l'anticorps 3E2 à une concentration de 40 $\mu\text{g/ml}$	104
Figure 20. Evaluation des rapports de la quantité protéique de phospho-Erk/actine en fonction des temps d'incubation des cellules HMEC-1 en présence de l'anticorps 3E2 à une concentration de 40 $\mu\text{g/ml}$	105

Figure 21. Niveau d'expression des protéines p-Akt et Akt totale en fonction du temps d'incubation des cellules HMEC-1 en présence de l'anticorps 3E2 à une concentration de 40 µg/ml. 105

Figure 22. Evaluation des rapports de quantité protéique de p-Akt/actine en fonction des temps d'incubation des cellules HMEC-1 en présence de l'anticorps 3E2 à une concentration de 40 µg/ml 106

Liste des Tableaux

Tableau 1. International Neuroblastoma Staging System : Classification des différents stades du neuroblastome selon des critères exclusivement cliniques réévalués en 1993.....	30
Tableau 2. Classification INPC	31
Tableau 3. International Neuroblastoma Risk Group : Classification des différents stades tumoraux du neuroblastome en fonction de facteurs cliniques, biologiques, histologiques.	32
Tableau 4. Les principales anomalies cytogénétiques clonales rencontrées dans le neuroblastome. .	43
Tableau 5 : Description des nouveaux stades tumoraux INRG	44
Tableau 6 : Prise en charge du neuroblastome en fonction du stade de la maladie.....	47
Tableau 7. Les mi-RNA comme cibles potentielles dans la thérapie du neuroblastome.....	63
Tableau 8. Consensus de marqueurs génétiques couramment utilisés pour la thérapie et pour les stratégies futures.....	78
Tableau 9. Corrélation entre les facteurs pro-angiogéniques et les facteurs de risques du neuroblastome.	85
Tableau 10. Molécules anti-angiogéniques approuvées.....	90
Tableau 11. Les molécules anti-angiogéniques en phase d'essais cliniques.....	91
Tableau 12. Anticorps utilisés dans l'immunoempreinte des protéines des cellules HMEC-1	100

Liste des abréviations

α MaR : *α Mouse α Rabbit*, anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre la souris et le lapin couplé à la HRP

ABTS : *2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt*, 2,2'-azinobis (3 - éthylbenzothiazoline-6 - acide sulfonique), sel de diammonium

Ac : acétylation

aCGH: *array-based comparative genomic hybridisation*, hybridation génomique comparative basée sur les puces

ADCC : *Antibody Dependant Cell Cytotoxicity*, cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

Akt (PKB) : *Protein Kinase B*, protéine kinase B

ALK : *anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase*, récepteur à la tyrosine kinase du lymphoma anaplasique

AREs : *Adenylate-uridylylate-rich elements*, domaine riche en éléments adénylate et uradylate

ARID3B : *AT-rich interaction domain molecule 3B*, domaine d'interaction de la molécule 3B riche en bases AT

ATCC : *American Type Culture Collection*, collection américaine de culture cellulaire

BAC : *bacterial artificial chromosomes*, chromosomes bactériens artificiels

BCA : *Bicinchoninic acid*, acide bicinchoninique

BCL2L11 : *Bcl-2-like protein 11*, protéine 11 Bcl-2-like

BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*, facteurs neurotrophiques issus du cerveau

bFGF : *basic Fibroblast growth factor*, facteur de croissance basique des fibroblastes

BIOT-GAM : *Biotine conjugated Goat Antimouse*, anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobuline de souris couplé à la biotine.

BMI-1 : *B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*, région homologue 1 Moloney-Virus de la leucémie murine d'insertion de lymphome B

BRCA1 : *Breast cancer-associated-1*, cancer du sein associé au gène 1

BSA: *Bovine Serum Albumine*, albumine de sérum bovin

CaMK- CARP : *calcium/calmodulin-dependent protein kinase-related peptide*

CAMTA1 : *Calmodulin-binding transcription activators 1*, facteur 1 activateur de transcription liant la calmoduline

CDC : *Complement dependent cytotoxicity*, cytotoxicité dépendante du complément

CDK6 : *cyclin dependent kinase 6*, cycline dépendante de la kinase 6

CDKN2A : *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*, cycline dépendante 2A l'inhibiteur de la kinase

Cer : Céramide

CpG : Cytosine-phosphate-Guanine

CRCNA : Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes-Angers

DCLK1 : *Doublecortin Like Kinase 1*, doublecortine like kinase 1

DKK1-3 : *Dickkopf 1-3*

DNMT : ADN méthyltransférases

ECL: *Chimiluminescence*, chimiluminescence

EGF : *Endothelial growth factor*, facteur de croissance endothélial

EMT : Epithélium mésenchymateux

ERK : *Extracellular signal-regulated kinases*, kinases régulées par signal extracellulaire

Fc : Fragment cristallisable de la chaîne lourde des IgG

18F-DOPA : Fluorine-18-L-dihydroxyphenylalanine

FGF : *Fibroblast growth factor*, facteur de croissance des fibroblastes

FISH : *Fluorescence In Situ Hybridization*, hybridation in situ par Fluorescence

Gb3cer: Globotriaosyl céramide

GD2 : Disialoganglioside GD2, II³ (NeuAc)₂-GgOse3-Cer

GM-CSF : *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, facteur de croissance pour macrophage et granulocyte

HABA: *2-(4'-HydroxyAzoBenzene)Benzoic Acid*, acide 2 - (4-hydroxyphénylazo)-benzoïque

HAT : Hypoxantine Aminoptérine Thymidine

HAT : Histones acétyltransférases

HCl : *hydrochloric acide*, acide chlorhydrique

HDAC : Histones déacétylases

HIF-1 : *Hypoxia-inductible factor 1- α* , facteur inductible d'hypoxie 1- α

HMEC-1 : *Human microvascular endothelial cells-1*, cellules endothéliales microvasculaires humaines de type 1

HVA : Acide homovallinique

HMVEC-L : *lung-derived normal human microvascular endothelial cells*, cellules endothéliales microvasculaires dérivées de poumon humain normal

HOX : *Homeobox proteins* : protéines de l'homéoboîte

HOXC9 : *Homeobox protein Hox-C9* : protéine Hox-C9 de l'homéoboîte

HRP : *Horseradish Peroxidase*, peroxidase du raifort

IDRF: *image-defined risk factor*, facteurs de risques définies par imagerie

IFISH : *interphase fluorescence in situ hybridisation*, hybridation in situ de l'interphase par fluorescence

IGF-2 : *Insulin-like Growth Factor-2* : Facteur de croissance-2 à l'insuline

IGR : Institut Gustave Roussy

IL-2 : *interleukin 2*, interleukine-2

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

LDH : Lactate déshydrogénase

MAM : *meprin/A5-protein/PTPmu* : méprine/A5 protéine/PTPmu

MBD : *Methyl binding protein* : Protéine liant un méthyl

MDM2 : *Mouse Double Minute 2* : oncoprotéine Double minute 2 Souris

MDR1 : *Multi-drug resistance 1*, protéine-1 de résistance à de multiples drogues

Me : méthylation

MeCP2 : *Methyl CpG binding protein 2*, protéine-2 liant un méthyl au CpG

MetAP2 : methionine aminopeptidase-2

MIBG : Méta-iodo-benzyl-guanidine

MKI : Index de mitose-karyorrhexis

MLH1 : *MutL homolog-1*, homologue mutL 1

MLPA : *multiplex ligation-dependent probe amplification*, amplification des sondes dépendante de la ligation multiplexe

MMP-2 : *Matrix metalloproteinase-2*, métalloprotéinase-2 de la matrice

MMP1 : inhibiteur synthétique des MMP

MSX1 : *Msh Homeo Box Homolog 1 Protein*, la protéine Homéoboîte MSX-1

NB : Neuroblastome

NESP55 : *Neuro-Endocrine Secretory Protein 55*, la protéine sécrétoire neuroendocrine 55

NeuAc : acide N-acétyl-neuraminique

NGF : *nerve growth factor*, facteur de croissance des nerfs

NPY : Neuropeptide Y

NSD1 : *Nuclear receptor-binding SET domain protein-1*, récepteur nucléaire liant le domaine 1 de la protéine SET

NT3 : *neurotrophin-3* : Neutrophine-3

NTRK1 : Neurotrophic tyrosine kinase receptor 1, récepteur à la neutrophine 1 à tyrosine kinase

OAcGD2 : disialoganglioside-O-acétylé

P : phosphorylation

PAGE : *Polyacrylamid Gel Electrophoresis*, électrophorèse en gel de polyacrylamide

p-Akt: phospho-Akt

PBS : *Phosphate-buffered saline*, tampon phosphate salin

PBS-BSA : *Phosphate-buffered saline - Bovine Serum Albumine*, tampon phosphate salin-albumine de sérum bovin

PCR : *Polymerase Chain Reaction*, réaction d'amplification génique

PDGF : *Platelet-derived growth factor*, facteur de croissance dérivé des plaquettes

PEDGF : *pigment epithelial-derived growth factor*, facteur de croissance dérivé de l'épithélium pigmentaire

p-ERK : phospho-ERK

PET : *positron emission tomography*, tomographie par émission de positon

PHOX2B : *Paired-Like Homeobox 2b*, facteur jumelé à l'homéoboîte 2 B

PLK1 : *Protein Polo-Like Kinase 1*, protéine kinase Polo-Like 1

PMT : photo-multiplicateur

SDS : *Sodium dodecyl sulfate*, sodium dodécyl sulfate

SFRP1 : *secreted frizzled-related protein 1*, la protéine 1 lié à la sécrétion frizzled

SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*, polymorphisme d'un unique nucléotide

SV40 : *Simian Virus 40*, virus Simien 40

TBS: *Tris Buffered Saline*, solution Tris-saline tamponnée

TBST: *Tris Buffered Saline-Tween*, Solution Tris-saline tamponnée- Tween

Tc-99-diphosphonate : Technetium-99-diphosphonate

TGF- α : *transforming growth factor-alpha*, facteur de croissance de transformation $\beta\alpha$

TGF- β : *Transforming Growth Factor- β* , facteur de croissance de transformation β

Tris : Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane

TSP-1 : thrombospondine-1

TWIST-1 : *Twist-related protein 1*, protéine-1 TWIST

Ub : ubiquitination

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VIP : Vasoactive intestinal peptide

VMA : Acide vanillylmandélique

WBR : *Western Blocking Reagent*, réactif de blocage d'immunoempreinte

Wig-1 : *wild-type p53-induced gene 1*, protéine p 53 sauvage induite par le gene 1

Wnt : *wingless-int*, site d'intégration sans aile

YB-1: *Y-Box-binding Protein-1* : Protéine 1 liant la boîte-Y

Avants propos

L'Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes (IRS-UN) est entré en service le 1^{er} juillet 2009. Il accueille les unités mixtes de recherche Inserm/Université de Nantes :

- Les équipes du Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes-Angers (UMR-Inserm 892- CNRS 6295) dirigées par le Dr Jacques Le Pendu,
- L'Institut du Thorax (UMR 915) dirigé par le Pr Pierre Picaud,
- Le laboratoire des vecteurs viraux pour le transfert de gènes in vivo (UMR 649) dirigé par le Dr.Philippe Moulier,

Les travaux de cette thèse, pour l'obtention du diplôme d'État de Docteur en Pharmacie, ont été réalisés lors de mon stage industriel de 5^{ème} année de pharmacie à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Nantes. Ce stage a été réalisé au sein du Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, à Nantes. Ce stage a été encadré et dirigé par le Dr Stéphane Birklé, au sein de l'équipe 14 (Radiobiologie et ciblage de l'endothélium) coordonnée par le Dr François Paris. Cette équipe s'intéresse à une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement du cancer : l'endothélium. Des études récentes ont montré que la destruction des cellules endothéliales qui forment les vaisseaux sanguins entraîne le développement de zones anaérobies, induisant la mort cellulaire. La destruction de ces vaisseaux induit la régression de la tumeur et une diminution des résistances. Des études menées par l'équipe 14 ont montré que l'apoptose des cellules endothéliales est directement impliquée dans la perte d'intégrité tissulaire et dans la régression de la tumeur après exposition à des radiations ionisantes, permettant d'affirmer que l'endothélium localisé dans le microenvironnement de la tumeur est une cible majeure des radiations ionisantes.

Les travaux de l'équipe consiste à mieux définir la réponse de cet endothélium tumoral face à la radiothérapie et à la chimiothérapie afin de limiter la toxicité vis-à-vis de l'endothélium sain. Cette équipe travaille sur quatre sujets de recherche différents :

- 1 - Identifier les voies de signalisation cellulaires radio-induites dans les cellules endothéliales, notamment celles initiées par le céramide.
- 2- Quantification des acteurs moléculaires sécrétés par les cellules endothéliales après irradiation induisant la mort des cellules tumorales avoisinantes par effet de voisinage ou effet bystander.
- 3- Le développement de nouvelles approches cliniques de radiothérapies ciblées.
- 4- Le ciblage de l'endothélium tumoral à l'aide d'anticorps thérapeutiques dirigés contre des marqueurs glycosphingolipidiques.

Introduction générale

Le cancer est la première cause de mortalité dans le monde occidental, dépassant depuis peu les maladies cardio-vasculaires. Cependant les tumeurs pédiatriques sont des tumeurs rares qui touchent approximativement 1 enfant sur 600 sur le territoire français. Les tumeurs les plus fréquentes chez les enfants sont représentées par les leucémies (30 %) suivi des tumeurs du système nerveux central (20 %), des lymphomes et maladie de Hodgkin, des sarcomes, des neuroblastomes, et des néphroblastomes (Loriot et Mordant , 2011).

Le neuroblastome représente 8 à 10 % des tumeurs pédiatriques et c'est la tumeur la plus commune dans le monde chez les nourrissons de moins de 1 an. Chaque année 2200 nouveaux cas sont diagnostiqués en Europe, aux USA et au Canada (Heck *et al.*, 2009). L'âge de diagnostic se situe essentiellement entre 1 an et 6 ans avec un pic maximal qui se situe à 2 ans (Loriot et Mordant, 2011). Les progrès de la médecine dans le diagnostic et la prise en charge de cette pathologie ont considérablement augmenté la survie des enfants. Cependant dans la moitié des cas, la maladie est diagnostiquée tardivement (stade IV), entraînant dans de nombreux cas le décès du patient, malgré un traitement multimodal agressif basé sur l'utilisation de la chirurgie, de la radiothérapie, de la chimiothérapie intensive, de l'autogreffe et des traitements d'entretiens. Le neuroblastome représente donc un défi pour la recherche médicale puisqu'il n'existe actuellement que peu de traitements curatifs pour ces enfants en stade IV de la pathologie.

Cette pathologie se définit actuellement comme une tumeur maligne embryonnaire des cellules de la crête neurale, d'étiologie mal connue.

Une tumeur abdominale a été décrite pour la première fois en 1864 par le médecin allemand R. Virchow comme un " gliome ". F. Marchand est le premier à décrire au niveau histologique en 1891 les caractéristiques des tumeurs provenant du système nerveux sympathique et de la médullosurrénale. Le stade IV S sans métastases osseuses chez des enfants a été décrit pour la première fois par W. Pepper, dans " *A study of congenital sarcoma of the liver and suprarenal with report of case* " (une étude d'un cas reporté de sarcome congénital de foie et des surrénales) (Pepper, 1901). En 1907, R. G. Hutchison, travaillant à l'hôpital pour les enfants malades de Londres, a rapporté un processus pathologique similaire avec des enfants plus âgés atteints de métastases oculaires et osseuses, dans son étude " *On suprarenal sarcoma in children with metastases to the skull* " (Un sarcome surrénal chez un enfant avec des métastases au crâne) (Hutchison, 1907). En

1910, J. H. Wright fut le premier à déterminer l'origine primitive de la tumeur : les cellules de la crête neurale. Il nomma cette pathologie neuroblastome dans sa publication " *Neurocytoma or neuroblastoma : a kind of tumor not generally recognized* " (Neurocytome ou neuroblastome : un type de tumeur qui n'est pas généralement reconnue) (Wright, 1910).

La chirurgie pédiatrique émergea lentement après la première guerre mondiale. W. Ladd et par la suite R. Gross ont perfectionné les techniques chirurgicales pour les enfants. R. Gross montra qu'il était possible de retirer des petites tumeurs localisées, entraînant la guérison du patient dans " *Neuroblastoma sympatheticum - a study and report of 217 cases* " (Neuroblastome sympathique : une étude sur 217 cas) en 1959 (Gross *et al.*, 1960). A partir des années 60, le traitement chirurgical est associé à la chimiothérapie afin d'améliorer le pronostic des patients (Rothenberg *et al.*, 2009).

Dans les dernières deux décennies, des progrès dans le diagnostic et le traitement du neuroblastome ont été réalisés. Des méthodes d'imageries médicales telles que l'échographie, le scanner, l'imagerie à résonance magnétique, le scanner, la scintigraphie au MIBG ont été développées. Des critères histologiques, des marqueurs biologiques, génétiques et chromosomiques ont également été définis et ont permis l'établissement et l'amélioration progressive de classifications de groupe de patients. Des protocoles associant la chimiothérapie à la chirurgie, à la radiothérapie voire à l'autogreffe de cellules souches ont été développées notamment pour le traitement des formes les plus agressives. Ces protocoles montrant leurs limites notamment dans le traitement du stade IV, des approches immunologiques notamment avec les anticorps thérapeutiques, des approches génétiques et galéniques et d'autres thérapies sont en cours de développement. Ces nouvelles approches permettront d'optimiser le ciblage des cellules tumorales, de diminuer les effets secondaires importants liés aux thérapies actuelles, et de permettre la guérison des patients atteints des formes les plus agressives de la pathologie.

**Première Partie. De la pathologie aux
nouvelles approches diagnostiques et
thérapeutiques**

I- Le neuroblastome

1- Définition

Le neuroblastome est une tumeur embryonnaire se développant au niveau de la crête neurale du système nerveux sympathique (Hoehner *et al*, 1996). Elle siège le plus souvent en arrière du péritoine au niveau des glandes surrénales. Chez 60% des enfants, il existe des métastases dès le diagnostic (IGR, 2004) situé essentiellement au niveau hépatique et osseux. Cette tumeur se caractérise par sa grande hétérogénéité, allant de la tumeur bénigne régressant spontanément à des formes agressives mettant en jeu le pronostic vital du patient. Bien qu'il s'agit d'une maladie rare, le neuroblastome reste la première cause de mortalité par cancer chez les patients de moins de 15 ans.

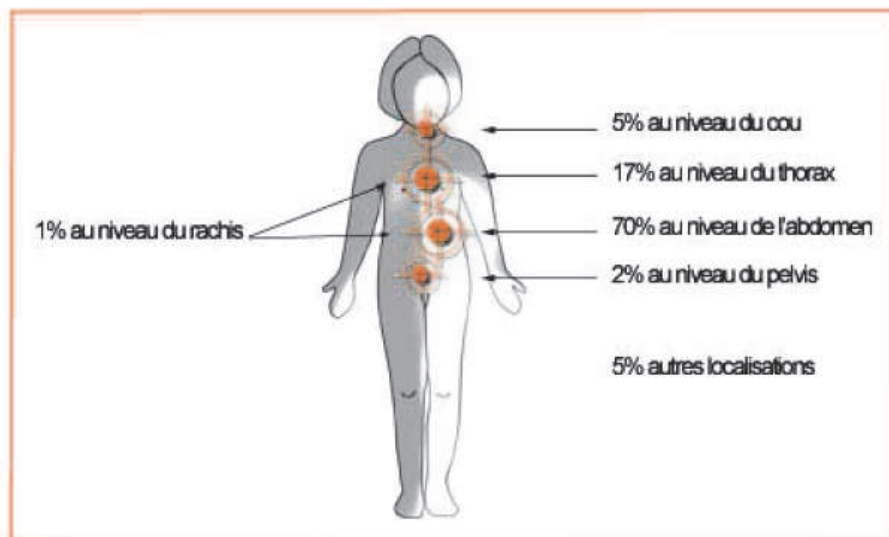


Figure 1 : Localisations tumorales rencontrées dans le neuroblastome

(D'après IGR, 2004)

2- Épidémiologie

Le neuroblastome est un cancer qui se développe aux dépens du système nerveux sympathique et représente 9 % des cancers de l'enfant. Il touche dans 98% des cas des enfants de moins de 6 ans et un tiers des cas sont découverts avant l'âge d'un an. Les neuroblastomes ont la possibilité de prendre spontanément une voie apoptotique (régression spontanée), ou une voie de différenciation formant alors un ganglioneurome (bénin) ou une

voie de prolifération plus ou moins agressive selon les anomalies géniques en cause (neuroblastome ou ganglioneuroblastome).

2-1- Prévalence

Le neuroblastome est une maladie rare, c'est-à-dire une maladie qui touche un nombre restreint de personnes en regard de la population générale. Le seuil admis en Europe est d'une personne atteinte sur 2 000, soit pour la France moins de 30 000 personnes pour une maladie donnée (Orphanet, 2013).

Le neuroblastome représente 8 à 10 % de l'ensemble des tumeurs pédiatriques mais est également la tumeur solide la plus fréquemment rencontrée chez l'enfant de moins de 5 ans. Dans de nombreux pays, la prévalence est identique ou légèrement supérieure chez les garçons (Gao *et al.*, 1997 ; Spix *et al.*, 2006 ; Maris *et al.*, 2003).

La prévalence la plus élevée est observée en Israël avec 15,1 cas pour un million d'habitants suivi par l'Europe de l'ouest et le Japon, avec respectivement 12,0 et 11,5 cas pour un million d'habitants. Elle est beaucoup plus faible en Afrique et Amérique centrale et du Sud avec 8,9 cas pour un million d'habitants à Cuba (Heck *et al.*, 2009).

2-2- Incidence

Plus de 600 nouveaux cas sont diagnostiqués aux Etats-Unis par an (Gurney *et al.*, 1996 ; Brodeur *et al.*, 1997) et 1500 cas par an en Europe (Heck *et al.*, 2009). L'âge médian de diagnostic du neuroblastome est de 22 mois et plus de 90 % des cas sont diagnostiqués avant l'âge de cinq ans (Brodeur *et al.*, 1997). L'incidence de la maladie est très importante dans les premières années de la vie puis diminue rapidement. La survenue de cas pendant l'adolescence ou chez l'adulte est plus rarement observée (Esiashvili *et al.*, 2007 ; Gaspar *et al.*, 2003). En effet, moins de 10 % des cas sont diagnostiqués après l'âge de 10 ans (Castleberry, 1997). L'âge médian de diagnostic chez les patients atteints d'un neuroblastome d'origine familiale est inférieur à celui des patients présentant un neuroblastome d'origine sporadique, c'est-à-dire d'origine inconnue et sans caractère épidémique (Ho *et al.*, 1993). L'incidence de la pathologie est maximale à l'âge de deux ans (Loriot et Mordant, 2011).

L'incidence du diagnostic prénatal du neuroblastome a augmenté ces trente dernières années avec l'utilisation croissante de l'échographie obstétricale (Jennings *et al.*, 1993 ; Hirata *et al.*, 1995 ; Holgersen *et al.*, 1996). Le diagnostic prénatal de cette pathologie s'effectue principalement entre la 18^{ème} et la 32^{ème} semaine de gestation.

2-3- Étiologie

L'étiologie du neuroblastome n'est pas totalement définie. L'implication de multiples facteurs dans l'apparition de cette pathologie tels que les virus (comme le cytomégalovirus), les agents chimiques (comme les pesticides), et les médicaments ont été étudiés mais aucune de ces études n'a mis en évidence un lien formel avec un facteur étiologique précis (Heck *et al.*, 2009).

Le neuroblastome est essentiellement une maladie sporadique. Seulement 1 à 2 % des cas diagnostiqués de neuroblastome sont d'origine familiale avec une transmission génétique autosomale dominante à pénétrance incomplète. Cependant même dans les cas familiaux, le comportement de la tumeur est souvent différent à l'intérieur d'une même famille. Plus récemment, des mutations au niveau du gène *anaplastic lymphoma kinases* (ALK) ont été observées dans les cas familiaux et des inhibiteurs de l'ALK sont actuellement explorés en phase I et II comme nouvel agent thérapeutique (Mueller et Matthay , 2009).

D'autres altérations génétiques ont été identifiées comme étant susceptibles d'être pré-disposantes au développement du neuroblastome. Une délétion du bras court du chromosome 1 (1p36) est une altération chromosomique caractéristique du neuroblastome. Ce locus étant suspecté de contenir de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs (Kato *et al.*, 2003 ; Tonini *et al.*, 1997), d'autres études ont été réalisées et ont mis en évidence la présence d'autres gènes pouvant être impliqués dans l'apparition de cette pathologie comme les locus 16p, 4p, 2p et 12p (Maris *et al.*, 1997 ; Perri *et al.*, 2002 ; Longo *et al.*, 2007). La complexité génétique de cette maladie pourrait être expliquée en partie par l'hypothèse " *Knudson's two-hit* " qui suppose que deux mutations successives au niveau de l'ADN soient nécessaires pour permettre le développement de la tumeur (Carlsen *et al.*, 1994 ; Tonini *et al.*, 2003 ; Knudson, 1971).

2-4- La mortalité

La mortalité liée au neuroblastome atteint approximativement 15 % des enfants. C'est la première cause de mortalité par cancer chez les enfants de moins de 15 ans. Le taux de survie à 5 ans aux États-Unis des enfants de moins d'un an atteints de neuroblastome est relativement stable depuis le milieu des années 70 et varie entre 78 et 95 %. Ce taux de survie pour les enfants âgés de 1 à 14 ans est passé de 35,1 % au milieu des années 70 à 64,8 % au début des années 2000 (Malcolm A. et al., 2010).

3- Classifications du neuroblastome

Plusieurs classifications sont employées ou ont été employées dans l'objectif de décrire le plus spécifiquement possible le stade et la forme de neuroblastome rencontrée. Les classifications présentées ci-dessous reposent essentiellement sur des critères cliniques et biologiques. Seules les classifications principalement utilisées sont présentées ci-dessous.

3-1- Système international de classement du neuroblastome (*International Neuroblastoma Staging System*)

Le neuroblastome est l'une des premières tumeurs où les facteurs cliniques et biologiques sont devenus des outils indispensables dans l'établissement du pronostic et la prise en charge thérapeutique du patient. L'utilisation de ces critères cliniques ont été validés par des investigateurs du monde entier qui ont établi une classification commune internationale des différents stades de neuroblastome : l'*International Neuroblastoma Staging System* (INSS) (Brodeur et al., 1988) (Tableau 1).

▼ Stades	▼ Caractéristiques anatomiques et histologiques
I	Tumeur limitée à son point d'origine. Ablation complète. Présence éventuelle de ganglions atteints inclus dans la tumeur.
II A	Tumeur limitée à son point d'origine. Ablation incomplète.
II B	Tumeur limitée à son point d'origine avec ablation complète ou incomplète. Les ganglions du côté atteint ne sont pas inclus dans la tumeur mais sont atteints à l'analyse histologique.
III	Tumeur localisée à un seul côté, non extirpable, traversant la ligne médiane*. Il existe ou pas d'envahissement des ganglions régionaux. ou Tumeur localisée à un seul côté ou tumeur de la ligne médiane* avec envahissement des ganglions des deux côtés. * La ligne médiane franchie signifie le bord de la vertèbre, du côté opposé à celui de la tumeur
IV	Tumeur, avec métastases (à l'exception des éléments de la définition du stade 4S).
IV S	Tumeur initiale limitée à son point d'origine, retirée totalement avec des métastases (foie, la peau et/ou la moelle osseuse) sauf au niveau de l'os.

Tableau 1. International Neuroblastoma Staging System : Classification des différents stades du neuroblastome selon des critères exclusivement cliniques réévalués en 1993.

(D'après IGR, 2004)

3-2- La classification internationale de la pathologie du neuroblastome (*International Neuroblastoma Pathology Classification*)

La classification INPC a été développée et proposée par Shimada en 1999 (Shimada *et al.*, 1999). Elle inclut le degré de différenciation des neuroblastes, la composition du stroma, l'*index de mitose-karyorrhexis* et l'âge, et permettait de distinguer quatre sous groupes présentés dans le tableau (Tableau 2).

Dénomination	Stroma	Sous-type des cellules neuroblastiques
Neuroblastome	Pauvre	-Indifférencié -Peu différencié -Différenciant
Ganglioneuroblastome mixte	Riche	Multiples foyers microscopiques de cellules neuroblastiques
Ganglioneuroblastome nodulaire	Riche par place Pauvre par place	-Nodules macroscopiques à stroma pauvre -Inclus dans de larges zones à stroma riche
Ganglioneurome	Riche	Schwannien prédominant

Tableau 2. Classification INPC

(D'après IGR, 2006)

L'INPC a évolué sur la base de la classification de Shimada en 2003 (Sano *et al.*, 2006) et possède maintenant des composantes pathologiques classées comme histologiquement favorable ou défavorable. Les critères histologiques de mauvais pronostic selon la classification de Shimada sont :

- Un neuroblastome à stroma riche nodulaire
- Un neuroblastome à stroma pauvre si :
 - + âge supérieur à 5 ans
 - + histologie indifférenciée depuis 1 an et demi
 - + MKI supérieur à 100 après 1 an et demi
 - + MKI supérieur à 200 après 1 an et demi

Les facteurs histologiques de bons pronostics sont :

- Un stroma riche non nodulaire à tout âge
- Un stroma pauvre différencié avec un MKI inférieur à 100 et un âge compris entre 1 an et demi et 5 ans
- Un stroma pauvre avec un MKI inférieur à 200 et un âge inférieur à 1 an

Dans la classification INPC, une tumeur non différenciée avec un stroma riche et un score MKI élevé est de mauvais pronostic.

3-3- Le groupe de risque international du neuroblastome (*International Neuroblastoma Risk Group*)

Suite à ces travaux, l'INRG, un panel d'experts internationaux, a mis en place un nouveau système (Monclair et al, 2009) de classification basé sur la validation de 13 facteurs cliniques, biologiques, génétiques et histologiques qui ont été mis en évidence dans différentes études (Tableau 3). Le système de classification INRG a permis l'élaboration de protocoles de prétraitement en fonction du risque, applicable dans le monde entier. L'INRG collecte actuellement les données les plus interprétables de nombreuses études pour la mise en place de futures stratégies de traitements.

Stade INRG	Âge (mois)	Histologie	Grade de différenciation de la tumeur	MYCN	Altération de 11q	Ploïdie	Groupe de risque avant traitement
L1/L2		GN mature GNB "intermixed"					A Très bas
L1		tous sauf GN mature ou GNB "intermixed"		NA			B Très bas
				Amp			K haut
L2	< 18	tous sauf GN mature ou GNB "intermixed"		NA	Non		D Bas
					Oui		G Intermédiaire
	> 18		Différencié	NA	Non		E Bas
					Oui		H Intermédiaire
	GNB Nodulaire ; NB	Peu différencié ou indifférencié	NA				
				A			N Haut
M	< 18			NA		Hyperdiploïde	F Bas
	< 12			NA		Diploïde	I Intermédiaire
	12 à < 18			NA		Diploïde	J Intermédiaire
	< 18			Amp			O Haut
	≥ 18						P Haut
MS	< 18			NA	Non		C Très bas
					Oui		Q Haut
				Amp			R Haut

Tableau 3. International Neuroblastoma Risk Group : Classification des différents stades tumoraux du neuroblastome en fonction de facteurs cliniques, biologiques, histologiques.

NA : Non amplifiée, GN : ganglioneurome, GNB : ganglioneuroblastome nodulaire.

(D'après Cohn et al., 2009)

3-4- Le Groupe d'Oncologie Pédiatrique (*The Children's Oncology Group*) (Monrovia, Californie, USA)

Le COG utilise comme facteurs principaux dans la classification du risque : l'âge, le stade post-chirurgical, l'amplification de l'oncogène *v-myc myelocytomatosis viral related oncogene neuroblastoma derived* (MYCN), des facteurs histologiques définis par le modèle de Shimida et la ploïdie de la cellule tumorale des patients (Mueller et Matthay, 2009). L'actualisation de ces classifications permet d'améliorer les protocoles préexistants mais également de développer de nouvelles voies de recherche avec l'inclusion progressive de ces nouveaux facteurs dans ces classifications.

4- Les manifestations cliniques

4-1- Les symptômes liés à la tumeur

L'ensemble de ces symptômes cliniques font du neuroblastome une maladie difficile à diagnostiquer et nécessite la mise en place d'examens complémentaires. Les symptômes cliniques de cette pathologie sont directement liés aux sites d'implantation de la maladie. Les signes cliniques révélateurs sont, soit en rapport avec la tumeur primitive, le plus souvent abdominale, explorée par échographie et scanner, soit en rapport avec les métastases, qui sont le plus souvent hépatiques chez les nourrissons et ostéomédullaires chez l'enfant de plus d'un an (IGR, 2004).

Les patients avec un site de développement de la tumeur au niveau abdominal sont susceptibles de développer des distensions, des douleurs et même des occlusions intestinales. Les patients présentant une compression des vaisseaux sanguins rénaux par la tumeur ou une hypersécrétion de cathécolamines, peuvent développer une hypertension artérielle vasculaire.

4-2- Les symptômes liés aux métastases

D'autres symptômes liés aux sites d'implantation des métastases peuvent être observés comme des douleurs localisées, une démarche douloureuse, des enflures périorbitaires et des ecchymoses provenant de l'infiltration de la tumeur dans les tissus sains et les os (Mueller et Matthey , 2009). Les patients ayant un neuroblastome au niveau du cou peuvent présenter des difficultés pour avaler et pour respirer. L'hépatomégalie est le symptôme dominant pour certaines formes métastiques observées chez le nourrisson (IGR, 2004).

Les patients présentant le stade IV S de la pathologie, définie par l'*International Neuroblastoma Staging System* (INSS) (Brodeur *et al.*, 1993), peuvent développer des lésions de la peau avec une décoloration bleuâtre et un syndrome lié à la présence de métastases hépatiques : le syndrome de Pepper.

4-3- Le neuroblastome en sablier

Le neuroblastome en sablier est une lésion paravertébrale touchant essentiellement les enfants de moins de un an. Il comprime la moelle épinière, ce qui entraîne une paralysie des membres inférieurs et des troubles de la sensibilité (IGR, 2004) mais également des troubles plus discrets comme des troubles de la miction et de la défécation qui sont plus difficiles à interpréter chez ces jeunes enfants. Ces complications deviennent définitives et nécessitent une chimiothérapie d'urgence pouvant dans certains cas être associé à un geste neurochirurgical.

4-4- Les syndrômes associés

4-4-1- Le syndrome de Pepper

Ce syndrome est essentiellement observé chez les enfants atteints d'un neuroblastome à un stade IV S, présentant des métastases hépatiques. Le syndrome de Pepper est marqué par l'installation rapide d'une hépatomégalie massive, homogène, très

ferme, à surface plus ou moins irrégulière, pouvant occuper tout l'abdomen dont la peau devient tendue et luisante (Lee *et al.*, 2002), masquant ainsi la tumeur primitive. Cette hépatomégalie peut générer des troubles respiratoires compressifs (IGR, 2004).

4-4-2- Le syndrome de Kerner-Morrison

Le syndrome de Kerner-Morrison se traduit par des diarrhées prolongées, avec une déshydratation et des pertes en potassium dû à la sécrétion du *vasoactive intestinal peptide* (VIP) par la tumeur (Chu *et al.*, 2011).

4-4-3- Le syndrome d'Horner

Le syndrome d'Horner est un trouble neurologique lié à la compression du ganglion cervical sympathique par la tumeur. Il entraîne diverses symptômes comme un ptosis homolatéral (paupières tombantes), un myosis ou encore une incapacité à transpirer du côté affecté du visage (Çağan E. *et al.*, 2010).

5- Les examens complémentaires

5-1- Dosage des métabolites urinaires

Tous les patients sont soumis à des analyses incluant une évaluation du taux des catécholamines urinaires et plus particulièrement le taux d'acide vanillylmandélique (VMA) et d'acide homovallinique (HVA) qui sont élevés chez plus de 95 % des patients atteints de neuroblastome (Figure 2).

Le dosage des cathécolamines donne des indications importantes. En effet, la quantité de métabolites des cathécolamines est proportionnelle à la masse tumorale pour les stades IV et IV S (classification INRG). De plus, la normalisation de ces métabolites est de bon pronostic lors du suivi thérapeutique mais ne signifie pas systématiquement une rémission.

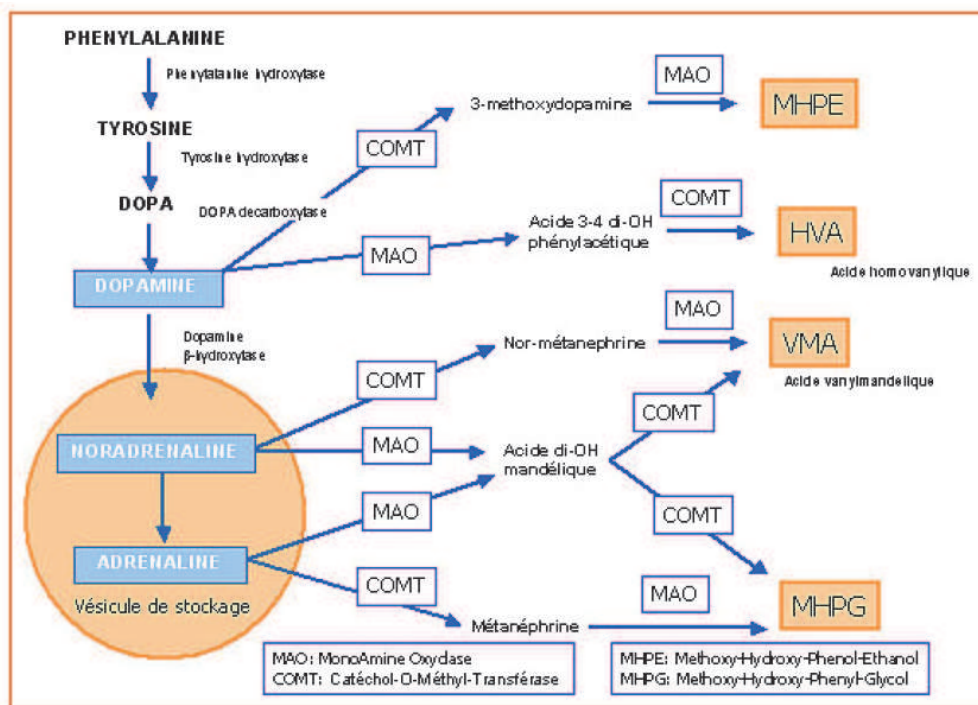


Figure 2. Métabolisme des cathécolamines

(D'après IGR, 2004)

5-2- Bilan loco-régional par imagerie médicale

5-2-1- L'échographie abdominale

Quand la tumeur est abdominale ou pelvienne, on l'explore d'abord par une échographie. Cet examen permet de voir et mesurer la tumeur, d'analyser ses relations avec les organes de voisinage et d'identifier des ganglions proches. De plus, l'échographie permet de guider une biopsie à l'aiguille fine indispensable pour l'étude de la biologie tumorale (IGR, 2006).

5-2-2- Le scanner

Le scanner, avec injection de produit de contraste, permet de localiser avec précision la tumeur primitive. Il donne une vision globale de l'espace anatomique concerné : cavité abdominale, thorax, région cervico-thoracique ou pelvis. On peut ainsi apprécier l'extension et l'opérabilité. Les appareils actuels permettent la reconstitution aisée d'images en trois dimensions rendant l'appréciation de l'opérabilité plus facile. Il montre la tumeur sous l'aspect d'une masse solide, comportant des calcifications dans plus de 80% des cas. L'examen permet l'analyse des rapports de la tumeur et des ganglions avec les organes de voisinage et les gros vaisseaux. L'examen visualise parfois une extension dans le canal formé par les vertèbres contenant la moelle épinière : tumeur dite " en sablier ". On distingue trois stades d'extension loco-régionale, identifiables au scanner (Figure 3).

▼ Stades	▼ Particularités anatomiques tumorales
I	Tumeur nettement séparée des structures de voisinage, en particulier des vaisseaux, par un liseré graisseux
II	Tumeur volumineuse et/ou située au contact des axes vasculaires qu'elle refoule sans qu'il soit possible de savoir s'il s'agit d'un simple contact ou d'une simple adhérence
III	Tumeur englobant un ou plusieurs axes vasculaires non resecables, tels que l'aorte et ses principales branches collatérales : tronc coeliaque et les artères mésentériques supérieures et inférieures

Figure 3 : Les stades d'extension loco-régionales observables avec le scanner.

(IGR, 2004)

5-2-3- L'Imagerie par Résonance Magnétique

L'IRM est complémentaire du couple échographie-scanner. Elle est surtout très performante pour visualiser les tumeurs en sablier. Cette extension est fréquente si la tumeur est développée le long de la colonne vertébrale, en particulier au niveau du thorax. (IGR, 2006). L'IRM présente l'avantage de ne pas irradier le patient et permet de confirmer une atteinte médullaire localisée (IGR, 2004). L'analyse du scanner ou de l'IRM permettra de décider de l'opérabilité de la tumeur au terme de discussions impliquant oncologue, chirurgien, radiologue. Une tumeur est opérable quand une exérèse complète peut être faite sans risque de complication grave, ni sacrifice d'organe (IGR, 2006).

5-2-4- La radiographie

Pour les neuroblastomes thoraciques, la radiographie du thorax de face et de profil détecte la masse tumorale et la localise dans la partie postérieure du thorax. Il est exceptionnel qu'il existe des métastases pulmonaires. (IGR, 2006)

5-3- **Bilan d'extension métastatique**

Les métastases osseuses sont évaluées par la méthode de la scintigraphie au Tc-99-diphosphonate. La scintigraphie est une méthode d'imagerie médicale qui procède par l'administration d'isotopes radioactifs afin de produire une image médicale, par la détection des rayonnements émis par ces isotopes après captation par les organes ou les tumeurs à examiner. Les radiographies du squelette ont un rôle limité et ne sont pas nécessaires excepté pour préciser des lésions douteuses trouvées sur la scintigraphie osseuse (Mueller et Matthay, 2009).

La scintigraphie avec l'utilisation de la métaiodobenzylguanidine est également acceptée et utilisée pour sa sensibilité et sa spécificité supérieure aux autres techniques aussi bien pour l'identification du stade initial de la tumeur que pour la surveillance de la maladie et la réponse des cellules tumorales aux traitements, plus particulièrement chez les

enfants ayant un risque élevé (Leung *et al.*, 1997 ; Katzenstein *et al.*, 2004). La MIBG est un radiopharmaceutique qui présente une structure analogue à la noradrénaline et qui s'accumule dans les tissus adrénergiques pouvant ainsi permettre la localisation des tumeurs.

Une aspiration de la moelle osseuse hématopoïétique, pour les métastases médullaires, ou une biopsie sont des éléments indispensables dans l'établissement du diagnostic de cette pathologie. Le diagnostic de la tumeur primitive est établi à partir des techniques d'imageries médicales comme l'IRM, le scanner et par la mise en évidence d'un taux élevé des métabolites des catécholamines urinaires (VMA, HVA). La scintigraphie à la MIBG et le bilan médullaire sont utilisés pour la recherche de métastases. La biopsie tumorale confirme le diagnostic et permet la classification de la tumeur (Orphanet, 2013).

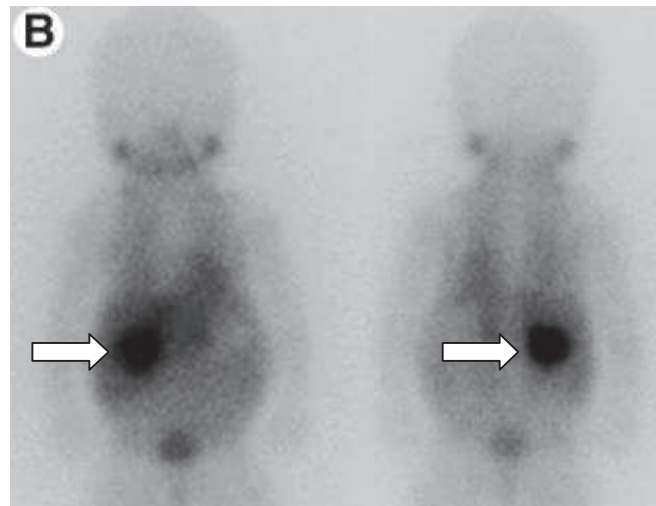


Figure 4 : Scintigraphie MIBG à l'iode 131 utilisé chez un enfant atteint de neuroblastome.

(D'après Howman-Giles *et al.*, 2007)

6- Les facteurs pronostiques

6-1- Le stade d'extension

Comme de nombreuses tumeurs, la vitesse de développement et d'extension des cellules tumorales est un fort facteur prédictif de la survie du patient.

En 2005, après de nombreuses révisions, le système de classification INRG a été mis en place. Ce système de classification, utilisant des techniques d'imageries préopératoires, a été désigné comme étant plus robuste et plus reproductible que les données opératoires utilisées dans les précédents systèmes comme dans la classification INSS (Monclair *et al.*, 2009).

6-2- L'âge

De nombreuses études, ont confirmé la capacité prédictive de l'âge dans le pronostic du neuroblastome. Par convention, l'âge limite utilisé pour déterminer le risque de mauvais pronostic par la majorité des groupes de coopération est de 12 mois (Brodeur *et al.*, 1997). Cependant, des analyses récentes du COG et des études sur des cohortes européennes ont indiqué que l'âge favorable peut être étendu jusqu'à 18 mois (London *et al.*, 2005 ; London *et al.*, 2005).

Chez l'adolescent, la tumeur se comporte de manière plus indolente mais a un pronostic plus défavorable. Cependant, dans ce cas, l'âge n'a pas été utilisé comme critère pour créer une séparation des différents traitements dans la classification des risques (Brodeur *et al.*, 1997 ; Esiashvili *et al.*, 2007).

6-3- Les marqueurs sériques

De nombreux marqueurs dans le neuroblastome ont été identifiés. Ils ont soit un potentiel prédictif important permettant d'évaluer l'issue de la maladie au moment du diagnostic, soit une corrélation avec le risque de rechute évalué lors du suivi de la

pathologie. L'apparition de signes cliniques de mauvais pronostic, associés à une élévation des marqueurs sériques au moment du diagnostic, incluant la ferritine sérique (> 142 ng/mL), la lactate déshydrogénase (> 1500 UI/L) et la neurone-spécifique éolase (> 100 ng/mL) conduit à un pronostic défavorable du patient (Shustter *et al.*, 1992 ; Berthold *et al.*, 1991). Ces marqueurs ne sont toutefois pas spécifiques du neuroblastome et aucun d'eux n'est utilisé pour la classification initiale du risque et la sélection des traitements (Mueller *et Matthay*, 2009).

6-4- Les marqueurs génétiques et moléculaires

La biologie de la tumeur est un élément indispensable pour déterminer le risque et les traitements recommandés (Maris *et al.*, 1999 ; Joshi *et al.*, 1993). La biologie de la tumeur est déterminée par la composition histologique de son tissu. Les récentes avancées dans les analyses cytogénétiques de la tumeur, rendront possible l'identification de nouvelles aberrations génétiques spécifiques qui deviendront l'un des marqueurs prédictifs les plus significatifs des tumeurs.

6-4-1- L'oncogène MYCN

L'oncogène MYCN est localisé sur le locus 2p24 et amplifié, sous forme extrachromosomique ou intrachromosomique, dans 17 à 20 % des cas de neuroblastome tout stade confondu, et dans 30 à 40 % des patients à risque élevé. Cette amplification génétique est limitée au tissu tumoral et plus fréquemment rencontrée en cas de métastases (Tonini *et al.*, 1997 ; Brodeur *et al.*, 1985). Cet oncogène est déterminé par de nombreuses techniques comme le Southern Blot, la PCR, l'immunocytochimie ou l'hybridation en fluorescence *in situ*. Cette dernière technique permet à partir d'une dizaine de cellules de déterminer le degré de variabilité de l'amplification au sein d'une population cellulaire d'une même tumeur (Sartelet *et al.*, 2002).

Une amplification de l'oncogène MYCN de plus de 10 copies est fortement associée à une histologie défavorable, à un stade avancé de la pathologie, à un comportement tumoral agressif et à un risque élevé de rechute (Bagatell *et al.*, 2009 ; Moreau *et al.*, 2006 ; Ambros *et al.*, 2009). En l'absence d'amplification du gène MYCN, le niveau d'expression de cette

protéine n'est pas directement corrélé au pronostic du neuroblastome (Bordow *et al.*, 1998, Cohn *et al.*, 2000). Celle-ci forme avec la protéine MAX un hétérodimère responsable de l'activation de plusieurs gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Norris *et al.*, 1997 ; Shohet *et al.*, 2002). Le mécanisme exact par lequel ce facteur de transcription conduit à des phénotypes plus agressifs reste inconnu.

6-4-2- La ploïdie de la cellule tumorale

La ploïdie de la cellule tumorale est un autre marqueur prédictif pour prédire l'évolution des patients atteints de neuroblastome. La valeur pronostique de ce facteur a été démontrée comme étant la plus significative chez les enfants de moins d'1 an, présentant un stade 4 avec un nombre normal de copie du gène MYCN (Look *et al.*, 1991 ; Bowman *et al.*, 1997 ; George *et al.*, 2005; Schneiderman *et al.*, 2008) et est évaluée par le rapport de l'index d'ADN (DI). L'index d'ADN se définit comme étant le contenu d'ADN nucléaire mesuré d'une cellule tumorale par rapport à celui attendu dans une cellule diploïde normale. Une étude récente a mis en évidence une augmentation des taux de survie à 11 ans avec un taux de 94 % pour les individus présentant un DI > 1 et un taux de 52 % pour les patients ayant un DI = 1 et montre l'intérêt de ce marqueur dans l'évaluation du pronostic de l'enfant (Bagatell *et al.*, 2005).

6-4-3- Les anomalies cytogénétiques clonales

Aucune de ces anomalies n'est spécifique et elles ne se retrouvent pas dans la totalité des cas de neuroblastome, mais certaines ont une valeur pronostique significative (Tableau 4). Cependant il existe une corrélation entre l'existence d'une délétion clonale 1p36 et le gain chromosomique 17q (Bown *et al.*, 1999), mais également une corrélation entre d'une délétion clonale 1p36 et les caractéristiques préalablement identifiées d'un neuroblastome agressif. Le marqueur 1p36 pourrait ainsi être associé à une fréquence élevée des rechutes sans influencer significativement sur la survie (Maris *et al.*, 2002).

Anomalies chromosomiques récurrentes observées dans les neuroblastomes

Anomalie chromosomique	Locus impliqué	Corrélation avec l'amplification de MYCN	Signification pronostique globale
17q+	17q21-qter	oui (directe)	défavorable
1p-	1p36	oui (directe)	défavorable
11q-	11q23	oui (inverse)	défavorable
14q-	14q23-qter	oui (inverse)	incertaine

Tableau 4. Les principales anomalies cytogénétiques clonales rencontrées dans le neuroblastome.

(D'après Pérel *et al.*, 2004)

6-4-5- Neurotrophines et récepteurs

Les neurotrophines (NGF : *neuronal growth factor* et BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*) interviennent au cours du développement du système nerveux central par l'intermédiaire de récepteurs à tyrosine kinase trk-a et trk-b (Pérel *et al.*, 2004). L'expression différentielle des récepteurs trk est étroitement liée aux caractéristiques évolutives des neuroblastomes. L'expression à un niveau élevé de trk-a est spécifiquement observée dans les neuroblastomes de stade limité et sans amplification de MYCN, alors qu'un niveau élevé de trk-b est exprimé dans les neuroblastomes agressifs ou avec amplification de MYCN, et à un niveau faible ou sous une forme tronquée dans les neuroblastomes d'évolution favorable (Nakagawara *et al.*, 1992 ; Nakagawara *et al.*, 1993 ; Suzuki *et al.*, 1993).

7- Les thérapies actuelles dans le neuroblastome

L'hétérogénéité observée entre les différentes formes de neuroblastomes a conduit à modifier la prise en charge existante au profit de deux stratégies :

- Dans le cas des tumeurs à pronostic favorable : l'allègement de la thérapie est préconisé avec l'utilisation parfois seule de la chirurgie.
- Dans le cas des tumeurs agressives : la tendance est à l'intensification de la prise en charge avec l'utilisation de la chirurgie combinée à la chimiothérapie myéloablatrice, la radiothérapie et parfois la greffe de cellules souches autologues. Malgré l'utilisation de ces

thérapies lourdes, de nombreux patients rechutent et meurent des suites de leur maladie. L'utilisation de l'immunothérapie en phase clinique et plus particulièrement de l'anticorps ch14.18 associé à différentes cytokines et autres molécules (Yu *et al.*, 2009) a démontré une efficacité importante dans la prévention de ces rechutes et une amélioration de la survie de ces patients.

7-1- La chirurgie

La chirurgie est utilisée dans les stades de la pathologie, elle consiste en une exérèse partielle ou totale de la tumeur. Elle peut être précédée de la chimiothérapie ou la radiothérapie pour diminuer la taille de la tumeur (Kushner *et al.*, 2003). Son utilisation dépend de la taille de la tumeur mais également de sa localisation et de son stade. Elle est utilisée en première intention excepté pour les stades métastatiques. Cet acte chirurgical est toujours soumis à une évaluation bénéfice/risque. La proximité de tissus nerveux ou de gros vaisseaux sanguins est le principal risque de complications lors de l'acte chirurgical (Tableau 5).

Stade tumoral	Description
L1	Tumeur localisée non impliquée dans les structures vitales, définie par la liste des facteurs de risques définis par imagerie (IRDF), et limitée à un seul compartiment
L2	Tumeur loco-régionale avec la présence d'un ou plusieurs IRDF
M	Stade métastatique distant (excepté stade MS)
MS	Stade métastatique chez l'enfant de moins de 18 mois avec des métastases limitées à la peau, le foie et la moelle osseuse

Tableau 5 : Description des nouveaux stades tumoraux INRG

(D'après Brisse H.J. *et al.*, 2011)

7-2- La chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement médicamenteux non spécifique entraînant la destruction des cellules tumorales mais également des cellules saines et par conséquent responsables d'effets indésirables importants chez le patient. La chimiothérapie initiale reste capitale dans la stratégie de traitement du neuroblastome. En effet, il s'agit d'une tumeur chimiosensible et 60% des patients ont des métastases au moment du diagnostic (IGR, 2006).

La prise en charge du neuroblastome s'effectue en quatre phases (Mueller et Matthay, 2009) :

- le contrôle local de la tumeur
- l'induction de la rémission
- la consolidation de la rémission
- la phase de maintien où l'objectif est de supprimer la maladie résiduelle

La phase d'induction est constituée de fortes doses de cisplatine et d'étoposide associé avec des cures en alternance de vincristine, de doxorubicine et de cyclophosphamide (Kushner *et al.*, 1994). Le topotécan est récemment utilisé après avoir prouvé son intérêt dans la prévention des rechutes (Längler *et al.*, 2002 ; Garaventa *et al.*, 2003). Les traitements d'induction permettent d'obtenir des réponses significatives dans 70 à 80 % des cas. Pour les tumeurs inopérables d'emblée (stade L2) la chimiothérapie permet de réduire la taille et ainsi d'en faciliter l'ablation complète dans un second temps. Dans tous les cas, elle est utilisée dans le traitement préventif ou curatif des métastases (IGR, 2006).

7-3- La greffe de cellules souches hématopoïétiques

L'objectif de ce traitement est le renouvellement complet de la moelle osseuse hématopoïétique d'un patient lorsque celle-ci est atteinte par des cellules cancéreuses dans les formes les plus graves de neuroblastome. Les cellules de la moelle osseuse

hématopoïétique sont entièrement éliminées à l'aide d'une chimiothérapie ou radiothérapie myéloablatrice. On réinjecte par la suite des cellules souches hématopoïétiques préalablement prélevées chez le malade. Ces cellules possèdent la capacité de recoloniser la moelle osseuse hématopoïétique et de renouveler les différentes populations sanguines permettant ainsi de limiter l'aplasie médullaire. Cette technique permet de diminuer le risque de rechute par rapport à un traitement de consolidation par chimiothérapie simple liée à la présence de cellules tumorales résiduelles naturellement chimiorésistantes.

Un essai clinique, le **HR-NBL1/SIOPEN**, a récemment montré la supériorité de l'association busulfan/méphalan (deux agents myéloablatifs) utilisée en Europe versus l'association carboplatine, étoposide, méphalan utilisé aux Etats-Unis chez des patients au stade métastatique. En effet, le taux de survie à 3 ans est de 60 % avec cette association alors qu'il n'est que de 48 % avec la carboplatine, l'étoposide et le méphalan. Le pourcentage de rechute et de progression de la maladie est également plus faible avec le busulfan et méphalan, 48 % versus 60 % avec la carboplatine, l'étoposide et le méphalan. L'utilisation de cette association est par conséquent recommandée comme standard dans la chimiothérapie myéloablatrice (SIOPEN, 2012).

7-4- La radiothérapie

La radiothérapie utilise la radioactivité pour détruire les cellules tumorales tout en minimisant l'effet sur les cellules saines avoisinantes. Le neuroblastome est une tumeur radiosensible. Néanmoins, la place de la radiothérapie dans le traitement fait toujours l'objet de discussions. Le risque de séquelles chez l'enfant de moins de 5 ans (grande majorité des enfants traités pour NB) conditionne, pour une large part, les discussions autour du rapport bénéfice/risque de cet outil thérapeutique (IGR, 2006). Cependant dans les formes, amplifiant MYCN, l'irradiation du site de la tumeur primitive après chimiothérapie et chirurgie complète est considérée comme le plus souvent nécessaire. Elle peut être également utilisée à titre palliatif dans les stades présentant des métastases osseuses douloureuses (IGR, 2006)

7-5- Les indications thérapeutiques

En fonction du stade de la pathologie et des différents facteurs pronostics évoqués précédemment, plusieurs schémas thérapeutiques sont envisageables (Tableau 6).

	Faible risque	Risque intermédiaire	Haut risque	Stade 4 S
Histologie	Tumeur localisée	Tumeur localisée avec extension locorégionale aux ganglions lymphatiques	Métastases ostéo-médullaires (sauf enfants < 1 an)	Métastases hépatiques et cutanées (avec faible envahissement médullaire) chez l'enfant < 1 an
Génomique tumorale	Chromosomes entiers	Chromosomes entiers	Abérations chromosomiques segmentaires	Chromosomes entiers
Traitements	Chirurgie	Chimiothérapie modérée et/ou chirurgie	Radiothérapie, chimiothérapie à haute dose et chirurgie ou chimiothérapie myeloablative avec greffe de cellules souches hématopoïétiques, traitements par anticorps anti-GD2 et isotrétinoïne (USA)	Chimiothérapie à faible dose et/ou radiothérapie si pronostic vital engagé par métastases hépatiques
Taux de survie à 5 ans	> 98 %	90 à 95 %	40 à 50 %	> 90%

Tableau 6 : Prise en charge du neuroblastome en fonction du stade de la maladie

(D'après Maris J.M., 2010)

8- La prise en charge de l'enfant en oncologie pédiatrique

8-1- Particularités et difficultés diagnostiques d'une tumeur chez l'enfant

Une notion qui paraît essentielle dans le diagnostic d'une tumeur chez l'enfant est la rapidité. En effet, les cancers de l'enfant évoluent très vite de quelques semaines à quelques jours selon les tumeurs.

Une série d'examens basée sur l'examen clinique, l'imagerie médicale et le diagnostic biologique est réalisée. Ces examens sont complémentaires et nécessaires pour classer rapidement et avec précision le stade de la pathologie (IGR, 2012).

8-2- L'annonce du diagnostic

L'annonce du diagnostic est une étape décisive de la prise en charge en oncologie pédiatrique. Le dispositif d'annonce débute dès l'accueil de l'enfant et de ses parents et se poursuit tout au long des étapes de la maladie. L'objectif est de délivrer une information claire et complète, mais également progressive et adaptée, tout en favorisant l'expression de l'enfant et de sa famille (IGR, 2012).

Ce temps est indispensable pour établir une alliance thérapeutique avec l'enfant et ses parents. Une prise en charge psychologique est mise en place pour l'enfant mais également pour ses parents et ses frères et sœurs. L'information donnée à l'enfant doit également prendre en compte le niveau de compréhension des parents et leur capacité à accepter que l'on informe.

8-3- Le traitement de l'hôpital au domicile du patient

Dans certains cas, des jeunes patients rentrent chez eux avec un dispositif permettant la poursuite du traitement. L'intervention d'une infirmière libérale à domicile est nécessaire pour retirer ce dispositif. Avant tout retour à domicile, un entretien avec l'infirmière est mis en place et permet également de faire le point avec le patient sur sa compréhension vis-à-vis

de la maladie et des éventuels effets secondaires liés au traitement qui peuvent apparaître dans les jours qui suivent sa sortie (IGR, 2012).

8-4- Le rôle du psychologue pour une prise en charge globale

L'accompagnement de l'enfant et de ses proches par des psychiatres ou psychologues cliniciens est nécessaire. Des entretiens réguliers avec un psychiatre ou un psychologue sont très utiles. Ils permettent à l'enfant d'exprimer ses peurs, ses chagrins et sa solitude (IGR, 2012) mais aussi aux parents de montrer leurs angoisses. Ils sont également indispensables pour maintenir l'alliance thérapeutique et éviter toute méfiance de l'enfant et de ses proches face à un changement de protocole thérapeutique.

8-5- Prise en charge palliative dans le neuroblastome

L'objectif des soins palliatifs est de soulager les douleurs physiques de l'enfant atteint d'une maladie grave, évolutive ou terminale. Ils prennent en compte également la souffrance psychologique et sociale de l'enfant et des parents. Ces accompagnements sont interdisciplinaires.

La prise en charge palliative du patient atteint de neuroblastome est basée sur le traitement symptomatique des effets secondaires liés à la prise en charge des formes les plus agressives comme les douleurs post-opératoires et les complications liées à la chimiothérapie ou la radiothérapie. La prise en charge psychologique et l'écoute du patient sont essentiels dans le traitement des symptômes les plus invalidants.

9- Les associations de patients

9-1- L'association Hubert Guin

L'association Hubert Guin " Enfance & Cancer " a été créée en 2004 par Anne et Olivier Guin suite au décès de leur fils Hubert atteint d'un neuroblastome.

Cette association a pour but d'aider et de promouvoir la recherche en oncologie pédiatrique, notamment sur le neuroblastome, afin de donner aux enfants des traitements

mieux ciblés, moins invasifs et mieux différenciés (Enfance et cancer, 2012). Les deux principales lignes d'action de cette association sont :

- L'organisation d'évènements annuels et ponctuels, sportifs et culturels ;
- La création de partenariat avec des entreprises nationales et internationales.

Plus de 94 % des fonds de cette association sont reversés aux projets de recherche sur le cancer de l'enfant, qui sont sélectionnés par un comité scientifique sur appel d'offre annuel.

9-2- L'association les Bagouz à Manon

Créée en 2005 par Anne Herbert-Bertonnier, suite au décès de sa fille atteinte d'un Neuroblastome, il y a tout juste 10 ans. L'association fabrique et vend ses bijoux créés par un collectif de mamans, organise des événements et collecte des dons pour financer directement les travaux de recherche les plus innovants sur les cancers de l'enfant, et le neuroblastome en particulier.

9-3- L'association la Hulotte

L'Association loi 1901 créée en novembre 2006 pour soutenir des causes difficiles et trop souvent isolées. L'objectif de la hulotte est très clairement de soutenir la recherche et toutes les actions autour du cancer de l'enfant (La Hulotte, 2012).

9-4- La fédération Enfants et Santé

L'association Enfants et Santé est créée le 16 juin 1998. Cette association déclarée régie par la loi de 1901, est reconnue d'Utilité Publique par le décret du 14 décembre 2005. Cette association lutte contre les cancers de l'enfant et de l'adolescent.

Aujourd'hui, la Fédération Enfants et Santé et ses 13 associations régionales organisent des conférences, manifestations médiatiques, et autres événements dans le but d'informer

et de sensibiliser le public aux cancers et leucémies de l'enfant et de l'adolescent (Enfant et santé, 2012).

9-5- L'étoile de Martin

L'association a été fondée en septembre 2006 à la suite du décès de Martin, atteint d'une tumeur au cerveau. L'association fédère et accueille des familles concernées par la maladie d'un enfant, mais également toute personne touchée par la cause et souhaitant s'engager à ses côtés. L'association, reconnue d'intérêt général, soutient la recherche sur les cancers de l'enfant et offre des moments de plaisir et de détente à des enfants hospitalisés. L'association est notamment soutenue par Estelle Denis et Fabrice Santoro (Etoile de Martin, 2006).

II- Les nouveaux marqueurs et les cibles thérapeutiques émergentes dans le neuroblastome

1- Les nouveaux marqueurs

Face à la difficulté de diagnostiquer cette pathologie rare, de nouveaux marqueurs diagnostiques et pronostiques sont indispensables pour prendre en charge plus précocement ces enfants. La recherche met en évidence de nouveaux marqueurs épigénétiques et génétiques plus spécifiques et précoces du cancer que les marqueurs biologiques actuellement utilisés. Certains de ces marqueurs sont plus spécifiques du neuroblastome. L'identification de ces marqueurs par les techniques actuelles de biologie moléculaire pourrait permettre la prise en charge plus précoce de ces patients. Cependant devant la rareté de la maladie, il est nécessaire d'identifier un marqueur spécifique du neuroblastome pour exclure le diagnostic de neuroblastome, pour que cette analyse génétique ou épigénétique soit réalisable au niveau hospitalier.

1-1- Les marqueurs épigénétiques

1-1-1- Rôle biologique de l'épigénétique

L'épigénétique a été définie pour la première fois par C. Waddington au début des années quarante pour expliquer les modifications génétiques qui ne suivaient pas les variations phénotypiques et l'interaction entre les gènes et l'environnement (Waddington, 1942). Récemment l'épigénétique se réfère à l'étude des changements hérités de la méiose ou de la mitose, dans l'expression des gènes en l'absence de mutations dans la séquence d'ADN (Berger *et al.*, 2009). Les régulations épigénétiques incluent deux processus qui sont la méthylation de l'ADN et les modifications covalentes des histones.

La méthylation de l'ADN débute à l'extrémité 5' de l'ADN au niveau d'une cytosine à l'intérieur d'un îlot de di-nucléotides CpG. Les trois principales DNMT sont la DNMT1, DNMT 3A et la DNMT 3B. La DNMT 1 maintient le profil de méthylation de l'ADN existant suite à la réplication de l'ADN. La DNMT 3A et la DNMT 3B sont des enzymes qui vont déméthyliser des sites CpGs. Les sites CpG sont soit concentrés dans les îlots CpG, qui sont des séquences courtes de l'ADN riches en CpG localisées dans 60 % des promoteurs des gènes soit ils sont localisés dans des régions plus larges de séquences répétitives comme les centromères ou

les rétrotransposons (Rodríguez-Paredes et Esteller, 2011). Bien que dans la plupart des tissus en cours de développement et différenciés, la majorité des îlots CpGs ne soit pas modifiée, la méthylation de la plupart des CpG permettent de prévenir de l'instabilité chromosomique (Suzuki et Bird, 2008) et donc de certaines pathologies comme le cancer.

Les histones sont des enzymes intervenant également dans les processus épigénétiques, au niveau de la structure des chromatines, et qui peuvent subir de multiples modifications post-traductionnelle (Kouzarides, 2007), en particulier au niveau de la queue N-terminale. Des enzymes comme les HAT ou les HDAC, sont responsables de l'ajout ou de la suppression de modifications. Des combinaisons variées de modifications dans des régions génomiques spécifiques comme " histone code " peuvent conduire à un état plus ouvert ou plus refermé de la chromatine. Cette modification de la structure de la chromatine est responsable de l'activation ou de la répression de l'expression de gènes (Li *et al.*, 2007).

1-1-2- Epigénétique et cancer

Les pathologies cancéreuses sont également caractérisées par des aberrations épigénétiques. Ces aberrations sont généralement caractérisées par un changement de la méthylation de l'ADN et des altérations des modifications des histones (Figure 5). La dérégulation épigénétique précède les étapes préliminaires des événements de transformation tumorale comme les mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs, les protooncogènes et l'instabilité génomique (Feinberg, 2005). La désorganisation de la machinerie épigénétique peut par conséquent provoquer l'expression aberrante des gènes et augmenter l'apparition de tous les processus caractéristiques du cancer chez les individus atteints (Esteller, 2008).

Les cellules cancéreuses présentent au niveau du génome une hypométhylation et une hyperméthylation des sites spécifiques CpGs (Esteller, 2008). Cette hypométhylation aberrante de l'ADN conduit à l'activation de nombreux protooncogènes et aboutit à une perte de l'empreinte (phénomène génétique qui réstreint l'expression d'un gène à un allèle : perte de l'hétérozygotie) comme dans le cas du gène IGF-2 dans la tumeur de Wilms (Ogawa *et al.*, 1993). Cependant la plus importante dérégulation épigénétique dans les tumeurs humaines concerne l'hyperméthylation des régions contenant des îlots CpGs et renfermant des promoteurs de gènes. Cette dérégulation entraîne la perte d'expression de gènes

suppresseurs de tumeurs comme CDKN2A, MLH1, BRCA1 (Jones et Baylin, 2007) et favorise le processus de cancérisation.

1-1-3- Le récepteur nucléaire se liant au domaine 1 de la protéine SET

D'autres modifications enzymatiques jouent un rôle important dans le cancer. Le NSD1, une histone méthyltransférase, est une enzyme impliquée dans la perte d'expression de promoteurs par hyperméthylation dans le gliome et le neuroblastome (Rodríguez-Paredes et Esteller, 2011). Cette mutation hétérozygote est responsable de syndrome d'hyperprolifération chez l'enfant associé à un risque élevé de cancérogénèse, appelé syndrome de Sotos (Berdasco *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2007).

1-1-4- La protéine 2 liant un méthyl au CpG

La MeCP2 fait partie de la famille des protéines de liaison de méthyl (MBD). Cette MeCP2 est essentielle pour le développement du cerveau humain et est impliquée dans le développement de plusieurs types de cancers, en particulier le syndrome de Rett, ou dans des perturbations du développement neuronal (Muotri *et al.*, 2011; Gonzales *et al.*, 2010). La MeCP2 se lie spécifiquement à des résidus méthylés d'îlots CpGs, localisés dans des régions inactives et hétérochromatiques de l'ADN. Elle interagit également avec le facteur de répression le SIN3A. Ce facteur recrute des histones déacétylases qui vont réprimer la transcription des promoteurs méthylés. Il a été montré que cette protéine interagissait avec le facteur de transcription MYCN dont l'amplification est un facteur prédictif de mauvais résultat. La protéine MeCP2 a un effet répressif sur la transcription de nombreux gènes, excepté quand MeCP2 interagit avec MYCN et d'autres facteurs de transcription (Derek *et al.*, 2011). Son interaction avec les régions promotrices de gènes qui ont un rôle important dans le développement du neuroblastome, comme les gènes ALK ou BDNF, reste encore inconnue (Derek *et al.*, 2011).

1-1-5- L'histone H3 triméthylée sur la lysine 4 et 27

Le gène du *domaine d'interaction de la molécule 3B riche en bases AT* (*AT-rich interaction domain molecule 3B*) (*ARID3B*) et *MYCN* sont des gènes exprimés et amplifiés chez certains patients atteints de neuroblastome. Il a été observé que dans les cellules embryonnaires, les gènes principaux du développement cellulaire sont activés ou réprimés en fonction d'une combinaison de deux modifications de sens opposés, dans les régions promotrices de ces gènes, au niveau des histones H3K4m et H3K27m (Mikkelsen *et al.*, 2007). En effet, la triméthylation sur la lysine 4 de l'histone 3, H3K4me, a été décrite comme étant responsable de l'activation de l'expression de gènes, alors que la triméthylation de la lysine 27 sur l'histone 3, H3K27, conduit à la répression de l'expression d'autres gènes (Rodríguez-Paredes et Esteller, 2011). Il a été montré récemment que la triméthylation de H3K4 au lieu de H3K27 dans les cellules embryonnaires de souris est en partie responsable de l'activation de ces oncogènes *ARID3B* et *MYCN* et du développement d'un processus tumoral, alors que la triméthylation H3K27 au lieu de H3K4 se produit normalement au cours de la différenciation de la crête neurale en cellules ganglionnaires sympathiques matures (Kobayashi *et al.*, 2012).

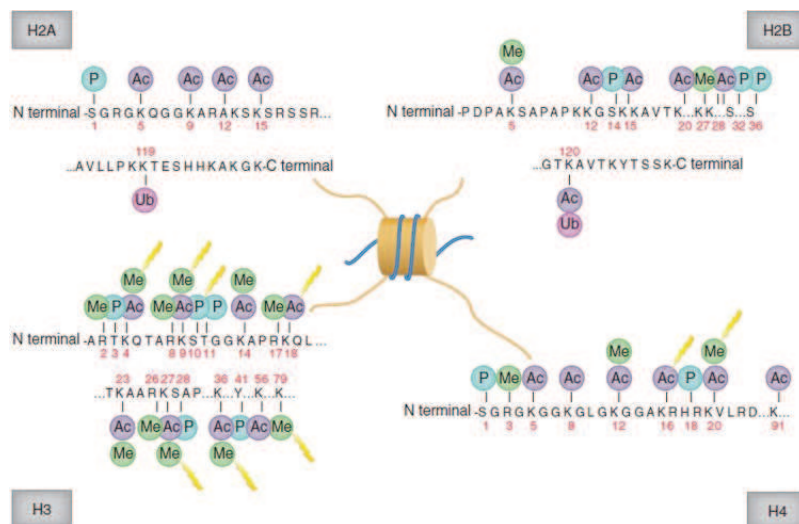


Figure 5. Modèles de modifications des histones dans la cellule saine et tumorale.

Principales modifications sur les quatre histones dans la cellule normale. Ces modifications contribuent à établir un état global et local de condensation et de décondensation de la chromatine. Les principales perturbations dans la cellule cancéreuse sont représentées par les éclairs. (D'après Rodríguez-Paredes et Esteller, 2011)

Le rôle des facteurs épigénétiques restent prépondérant dans les processus de cancérisation. Les histones déacétylases interviennent dans l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur tels que les gènes codant pour les protéines p21WAF1/CIP1, p16, p57Kip2, et p19INK4d. Il a été reporté que des inhibiteurs de ces histones déacétylases pouvaient permettre la réexpression de gènes suppresseurs de tumeurs et par conséquent l'expression de ces protéines régulant le cycle cellulaire (Emanuele *et al.*, 2008). D'autres mutations au niveau génétique et moléculaire participent à ce processus de cancérisation dans le neuroblastome.

1-2- Les marqueurs moléculaires

1-2-1- Les variants alléliques du gène du facteur de transcription activateur 1 de la calmoduline

Le gène CAMTA1 est localisé sur le chromosome 1p, délété dans 30 % des neuroblastomes et plus particulièrement sur le locus 1p36, dans la région 1p36.3. La protéine CAMTA1 est un régulateur du cycle cellulaire, et est exprimée principalement dans le tissu neuronal (Nagase *et al.*, 1998).

La sous expression de la protéine CAMTA1, due à des mutations génétiques, comme le remplacement d'une cytosine par une thymidine en position 4007 (Henrich *et al.*, 2007), est prédictif d'un mauvais pronostic (Hernrich *et al.*, 2006). Deux autres mutations sur les régions codantes de ce gènes ont été décrites, comme la substitution 3531C > G et 3653A > C, mais sont également retrouvées chez des individus sains (Henrich *et al.*, 2007). Cette mutation et la recherche d'autres mutations au sein du gène CAMTA1 peuvent être de marqueurs potentiels intéressants dans le diagnostic et le pronostic du neuroblastome.

1-2-2- Le polymorphe c.1810C>T du gène au récepteur tyrosine kinase de la neutrophine

Le gène NTRK1 code pour le récepteur TrkA situé sur le locus 1q21-q22 et composé de 17 exons (Weier *et al.*, 1995 ; Greco *et al.*, 1993). Le polymorphisme de ce gène a été observé dans un nombre restreint de cas de cancer de la prostate, de carcinome papillaire de la thyroïde et de neuroblastome (Scaruffi *et al.*, 1999 ; Gimm *et al.*, 1999 ; George *et al.*, 1998).

L'allèle c.1810C>T a été observé dans 8,6 % des cas de neuroblastome sporadiques. La présence de cet allèle est corrélée avec un taux de survie inférieur à 5 ans et avec des phénomènes de rechute fréquent (Lipska *et al.*, 2009). Aucune corrélation entre ce marqueur potentiel et l'amplification de MYCN ou avec l'âge n'a été mise en évidence. Des taux de survie inférieurs chez les enfants présentant ce polymorphisme ont été décrits et encore plus particulièrement chez les enfants de moins de 18 mois sans amplification de MYCN. L'allèle c.1810C>T semble être un nouveau marqueur indépendant de mauvais résultats chez les enfants atteints de neuroblastome, en particulier chez les enfants de moins de 18 mois sans amplification de MYCN (Lipska *et al.*, 2009).

1-2-3- Les micro-ARN miR-487b et miR-410

L'essor des biotechnologies a permis la découverte de l'expression de nombreux micro-ARNs (miRNA) dans plusieurs types de cancer. Les mi-RNA sont de petites molécules endogènes non codantes d'ARN qui régulent l'expression des gènes par dégradation de l'ARNm ou par prévention de la traduction de séquences spécifiques incorrectes en interagissant avec la région 3' non traduite de ces ARNm (Gattolliat *et al.*, 2011). La dérégulation de l'expression de 157 miRNA localisés sur 32 *loci*, responsable de l'expression de tumeurs à pronostic favorable ou défavorable, a été décrite dans le neuroblastome (Chen Y. and Stallings R.L., 2007). Un grand nombre de ces *loci* sont sous exprimés dans les tumeurs présentant une amplification de l'oncogène MYCN (Schulte *et al.*, 2008; Bray *et al.*, 2009) et la sous-expression de 20 miRNA dans des neuroblastomes avec une amplification de MYCN a été récemment rapportée (Schulte *et al.*, 2010).

Plus récemment le rôle pronostic de deux mi-RNA spécifiques dans le neuroblastome, le miR-487b et le miR-410 codé par le *locus* 14q32.31, a été décrit. La faible expression de ces deux mi-RNA est significativement associée à des phénotypes à haut risque de neuroblastome, indépendant de l'amplification de MYCN. Il a été montré que les patients présentant des niveaux élevés de miR-487b et miR-410 avaient de meilleures chances de survie que les patients présentant une sous-expression de ces deux marqueurs. Il a été également démontré que la sous-expression de ces deux mi-RNA pouvait prédire la rechute des patients atteints de neuroblastome, classés actuellement à faible risque (Gattolliat *et al.*, 2011).

1-2-4- Le facteur de transcription jumelé à l'homéoboîte 2b et à la protéine homologue Msh de l'homéoboîte

Le facteur de transcription PHOX2B a été décrit comme l'un des gènes régulateurs de la différenciation du système nerveux sympathique périphérique. Ce gène est muté dans les neuroblastomes sporadiques et familiaux. Ce facteur de transcription joue un rôle clé dans la différenciation des lignées cellulaires de la crête neurale en cellules du système sympathique. L'activité de ce facteur est indispensable dans la constitution du système noradrénergique. Cependant son rôle précis dans la régulation du système noradrénergique reste inconnu. Le facteur PHOX2B régule l'expression du facteur de transcription MSX1 impliqué dans le développement précoce de la crête neurale (Revet *et al.*, 2008).

Ce facteur MSX1 inhibe la prolifération et la formation de colonies de cellules tumorales. Il joue également un rôle clé dans la voie de signalisation Delta-Notch, impliquée dans les phénomènes de différenciation, prolifération et de survie de la cellule mais également dans l'angiogénèse embryonnaire ou tumorale. Il intervient également dans la voie de signalisation Wnt (Figure 6) impliquée dans de nombreux cancers comme le neuroblastome (Bach *et al.*, 2003; Sauka-Spengler *et al.*, 2008; Raible *et al.*, 2006). Ce facteur MSX1 induit l'expression de quatre gènes inhibiteurs de la voie de signalisation Wnt : DKK1-3 et le gène SFRP1 dont l'expression élevée chez les patients atteints de neuroblastome est corrélée à bon pronostic (Revet *et al.*, 2010). Le facteur MSX1 est sous exprimé par l'induction de l'expression de PHOX2B (Revet *et al.*, 2008) dans les cellules tumorales de

neuroblastome, qui joue par conséquent un rôle important dans le développement de la maladie. Ces deux facteurs de transcription sont des marqueurs potentiels de neuroblastome de pronostic défavorable.

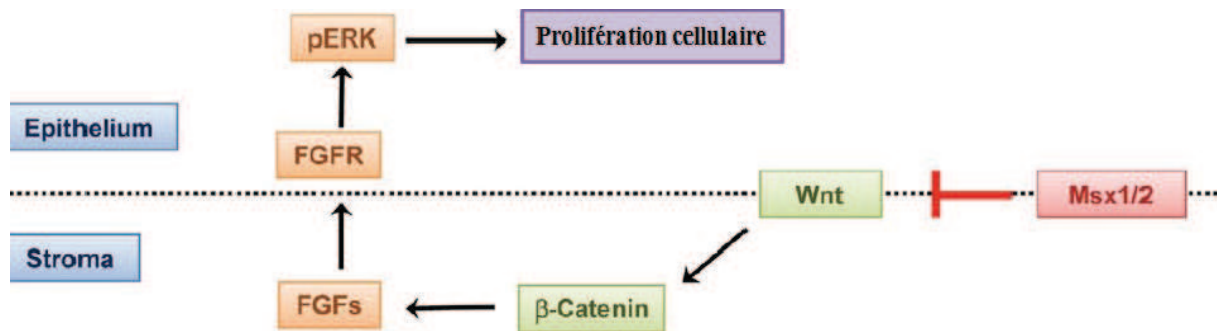


Figure 6. Inhibition de la voie de signalisation Wnt par le facteur de transcription MSX1

Dans la cellule saine MSX1 réprime l'action de la protéine Wnt et de la β -Caténine, inhibant la voie de signalisation FGFR-ERK1/2. (D'après Shanmugasundaram *et al.*, 2012)

1-2-5- Le facteur de transcription de la boîte Y de liaison à la protéine 1

Le facteur de transcription YB-1 est un membre de la famille des protéines se liant à l'ADN, responsable de la transcription de facteurs oncogéniques surexprimés dans de nombreux cancers comme les cancers du poumon, de la prostate et du sein. Le YB-1 active des gènes associés à la prolifération cellulaire comme les gènes codant pour la MMP-2, la MDR1. Il réprime également des gènes associés à la mort cellulaire et codant pour l'expression de protéines telles que la *FAS* et *p53* (Wachowiak *et al.*, 2010).

Une surexpression de ce facteur de transcription a été observée chez de nombreux patients présentant également une amplification de l'oncogène N-Myc et une perte d'hétérozygotie du chromosome 1p. Ce facteur de transcription est retrouvé dans tous les stades tumoraux (Wachowiak *et al.*, 2010). Les spécificités de YB-1 font de ce facteur un marqueur potentiel du neuroblastome voire une future cible thérapeutique même si une corrélation significative entre ce facteur et la survenue d'un neuroblastome n'a pas été démontrée.

1-2-6- La protéine de l'homéoboîte Hox-C9

La HOXC9 fait partie de la famille des protéines de l'homéoboîte (HOX). Les gènes de l'homéoboîte codent pour des séquences hautement conservées au sein des espèces et jouent un rôle important dans la morphogénèse de tous les organismes pluricellulaires. Ces protéines sont des médiateurs indispensables de l'action de l'acide rétinoïque dans le développement du système nerveux (Alexander *et al.*, 2009 ; Maden *et al.*, 2007).

Une surexpression de cette protéine HOXC9 a été mise en évidence dans les formes différenciées de neuroblastome. La protéine HOXC9 induit l'arrêt du cycle cellulaire et la différenciation neuronale dans le neuroblastome par ciblage des promoteurs du cycle cellulaire et des gènes de différenciation neuronale (Mao *et al.*, 2011). La surexpression de cette protéine est induite par l'acide rétinoïque et sa répression confère aux cellules tumorales de neuroblastome une résistance à l'arrêt du cycle cellulaire induit par l'acide rétinoïque et à la différenciation cellulaire (Mao *et al.*, 2011). Le rôle clé de cette protéine dans la différenciation du neuroblastome, en fait un marqueur prédictif intéressant dans le neuroblastome.

1-2-7- La protéine sécrétoire neuro-endocrine 55

La protéine NESP55 est un nouveau membre de la famille des chromogranines (Li *et al.*, 2002). Cette famille de protéine est contenue dans les vésicules des neurones ou des cellules endocrines. Cette protéine se retrouve co-exprimée avec la chromogranine A, qui est exprimée dans le neuroblastome (Jakobsen *et al.*, 2003) et en particulier dans les phénotypes hypoxiques du neuroblastome, responsables de la résistance aux chimiothérapies et à la radiothérapie.

La protéine NESP55 se trouve communément dans le neuroblastome et est principalement associée à une diffusion limitée de la tumeur liée à l'hypoxie. L'expression de ce marqueur est également étroitement liée à des signes morphologiques de maturation de la tumeur. La NESP55 est un marqueur sensible de la métaplasie de la chromafine dépendant de l'hypoxie dans le neuroblastome, qui représente la forme de différenciation dominante dans ce type de tumeur (Hedborg *et al.*, 2011).

2- Les cibles thérapeutiques émergentes

2-1- Les cibles moléculaires

Le développement de nouvelles thérapies pour améliorer le traitement du neuroblastome et la réduction des effets secondaires liés au traitement est une nécessité. Par conséquent l'identification et la validation de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des enfants à haut risque de neuroblastome est une priorité. Certaines de ces cibles génétiques et moléculaires sont présentées ci-dessous.

2-1-1- Le gène de la Doublecortine Like-Kinase

Le gène DCLK1 code pour l'expression de la protéine DCLK1 qui fait partie de la famille des protéines DCLK. Ces protéines interviennent dans le développement du système nerveux et jouent un rôle important dans la migration neuronale. Le DCLK1 est exprimé dans le neuroblastome (Nakagawara et Ohira, 2004). Le gène DCLK1 code pour plusieurs variants dont les principaux sont DCL, DCLK-long, DCLK-court et la *CaMK*- CARP (Dijkmans *et al.*, 2010).

Parmi ces variants, le DCL et le DCLK-long sont surexprimés dans le neuroblastome humain et sont indispensables à la prolifération et à la survie des cellules tumorales (Verissimo *et al.*, 2010). Une diminution de l'expression de ces variants est responsable d'altération dans le cycle cellulaire et de l'apoptose. L'apoptose de la cellule tumorale serait induite par inhibition des protéines stabilisant les fuseaux mitotiques mais également par induction des mécanismes de stress oxydatif (Verissimo *et al.*, 2011). Un autre mécanisme pro-apoptotique de ces cellules de neuroblastome est la perturbation du transport intracellulaire des protéines de signalisation due à la répression de DCL et de DCLK-long. Par conséquent la répression du gène DCLK 1 induit l'apoptose des cellules tumorales du neuroblastome et est une cible spécifique potentielle dans la thérapie du neuroblastome.

2-1-2- Les micro-ARN

Les mi-RNA sont des modulateurs importants de l'expression génique et sont impliqués dans les processus d'homéostasie tel que le développement cellulaire. L'expression de ces mi-RNA joue un rôle dans la prolifération du neuroblastome (Chang *et al.*, 2007). Plusieurs mi-RNA sont impliqués dans les processus de cancérisation (Tableau 7).

Les miRNA-17 et miRNA-20a ciblent la protéine p21, un régulateur négatif de la transition de la phase G1 à la phase S, et plus particulièrement le miR-17 qui cible également la protéine pro-apoptotique BCL2L11 (Fontana *et al.*, 2008). Récemment il a été mis en évidence que le miRNA-17-92 agissait sur plusieurs effecteurs tels que le (TGF β) impliqué dans la cascade de signalisation cellulaire du neuroblastome (Mestdagh *et al.*, 2011).

Un autre mi-RNA, miRNA-380-5p, est surexprimé dans le neuroblastome à MYCN amplifié et associé à un mauvais pronostic. Le miRNA-380-5p module l'expression de p53, une protéine clé dans le cycle cellulaire et dans les processus de cancérisation, permettant la prolifération des cellules tumorales dans le neuroblastome (Swarbrick *et al.*, 2010). Ces mi-RNA ont un rôle prépondérant dans les processus de cancérisation et sont par conséquent des cibles thérapeutiques spécifiques potentielles et intéressantes.

mi-ARN	Cibles validées	Fonctions/processus	Types	Références
miR-17-5-p-92 cluster	Signalisation TGF- β , CDKNA1 (p21); BCL2L11 (BIM) NYMC	Prolifération cellulaire, adhésion cellulaire	Oncogène	Fontana <i>et al.</i> (2008)
miR-34a	NYMC, BCL-2, E2F3	Progression du cycle cellulaire, apoptose, réparation de l'ADN et angiogénèse	Gène suppresseur de tumeur	Welch <i>et al.</i> (2007) Cole <i>et al.</i> (2008) Wei <i>et al.</i> (2008)
miR-184	AKT 2	Différenciation neurale et/ou apoptose	Gène suppresseur de tumeur	Foley <i>et al.</i> (2010) Tivnan <i>et al.</i> (2010)
miR-380-5-p miR-9	p53 E-cadhérine, Tropomyosine liée à la kinase C	Apoptose Prolifération cellulaire, apoptose	Oncogène Oncogène	Swarbrick <i>et al.</i> (2010) Laneve <i>et al.</i> (2007) Ma <i>et al.</i> (2010) Khew-Goodall (2010)
miR-125a	Bmf, Tropomyosine liée à la kinase C	Prolifération cellulaire, apoptose	Oncogène	Laneve <i>et al.</i> (2007)
miR-125b	Bmf, Tropomyosine liée à la kinase C	Prolifération cellulaire, apoptose	Oncogène	Laneve <i>et al.</i> (2007)
miR-152	CHUK, CUL5 et GADD45A	Différenciation des neuroblastes, migration/invasion et apoptose	Oncogène	Ragusa <i>et al.</i> (2010)
miR-338	PTPRT	Différenciation des neuroblastes, apoptose	Oncogène	Ragusa <i>et al.</i> (2010)
miR-200B	ZEB 1	Différenciation des neuroblastes, migration/invasion et apoptose	Gène suppresseur de tumeur	Ragusa <i>et al.</i> (2010)

Tableau 7. Les mi-RNA comme cibles potentielles dans la thérapie du neuroblastome

(D'après Verissimo C.S. *et al.*, 2011)

2-2- Les cibles protéiques

2-2-1- Le récepteur à la tyrosine kinase du lymphome anaplasique

Le récepteur ALK normalement exprimé seulement pendant le développement embryonnaire et au niveau du cerveau néonatal (Carpenter *et al.*, 2011; Iwahara *et al.*, 1997). Le récepteur ALK est un membre de la super famille des récepteurs à l'insuline et a été décrit pour la première fois dans le lymphome non-Hodgkinien à cellules larges. La protéine ALK est un récepteur constitué d'une unique chaîne d'acides aminés avec des domaines extracellulaires contenant deux domaines *meprin/A5-protein/PTPmu* (MAM) et un domaine à lipoprotéine de faible densité (Figure 7). L'activation du récepteur ALK est liée à des processus cellulaires, qui sont reliés à l'oncogénèse comme la progression dans le cycle cellulaire, la survie et la migration cellulaire dans les cellules exprimant des formes tronquées de l'ALK. Des mutations au niveau du domaine tyrosine kinase de l'ALK ont été observées et décrites comme étant la cause majeure de l'apparition des formes héréditaires neuroblastome (Mosse *et al.*, 2008). L'activation de l'ALK peut être également à l'origine des formes somatiques (Janoueix-Lerosey *et al.*, 2008) caractérisées par la présence de mutations toujours au niveau du domaine à tyrosine kinase.

La mutation R1275 est la mutation la plus fréquente de l'ALK dans le neuroblastome humain et est détectée dans plus de 50 % des tumeurs présentant des mutations de l'ALK. Dans le neuroblastome sporadique, les mutations les plus fréquentes se situent au niveau des positions R1275, F1174, et F1245 et elles activent toutes l'ALK. Plusieurs données ont montré que la mutation R1275 était responsable du changement de la conformation auto-inhibitrice de la tyrosine kinase, et par conséquent de son activation (Figure 12). Des inhibiteurs de l'ALK kinases comme le crizotinib sont actuellement en phase 2 des essais cliniques et représentent un outil thérapeutique potentiel dans le traitement du neuroblastome (Carpenter et Mossé, 2012).

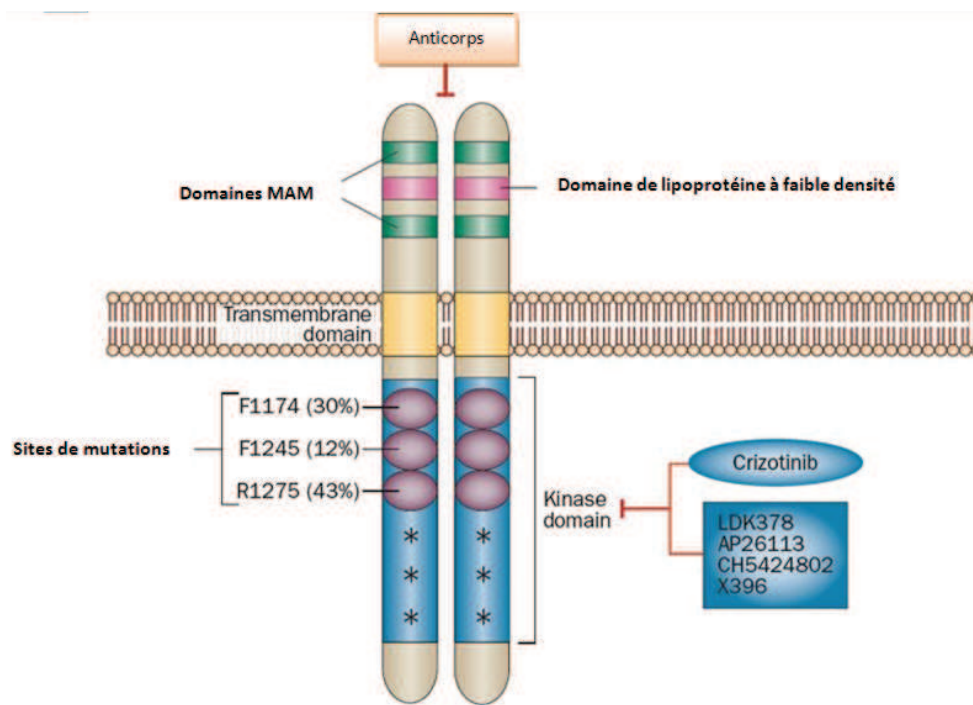


Figure 7. Structure de la protéine ALK et mutations retrouvées dans le neuroblastome.

Deux domaines MAM, un domaine de lipoprotéine à faible densité, un domaine transmembranaire et un domaine tyrosine kinase sont représentés avec les trois mutations les plus fréquemment rencontrées dans le neuroblastome sporadique au niveau du domaine de la tyrosine kinase. (D'après Carpenter et Mossé, 2012)

2-2-2- L'oncoprotéine Double minute 2 Souris

L'oncoprotéine MDM2 est une protéine clé dans le processus de cancérisation. La protéine MDM2 est le principal inhibiteur de la protéine p53 en provoquant son ubiquitination et la répression de son activité transcriptionnelle par formation d'un complexe avec la MDM4 et la ligase UBCh5a (Singh *et al.*, 2007). L'inhibition de MDM2 s'effectue par la protéine suppressive de tumeur p14^{ARF} qui en se liant au MDM2 empêche la dégradation de la p53 et favorise son activité (Sherr, 2006). La suppression de p14^{ARF}, à travers de multiples mécanismes comme une délétion ou une inactivation épigénétique, ou son inhibition par des facteurs inhibiteurs tels que BMI-1 (Novak *et al.*, 2006) et le TWIST-1 (Valsesia-Wittman *et al.*, 2004) sont responsables de l'activation accrue de MDM2 et de la rechute de certains patients atteints de neuroblastome (Figure 8). Des inhibiteurs de l'oncoprotéine MDM2 pourraient être développés pour le traitement des formes de neuroblastomes les plus agressives et chimiorésistantes.

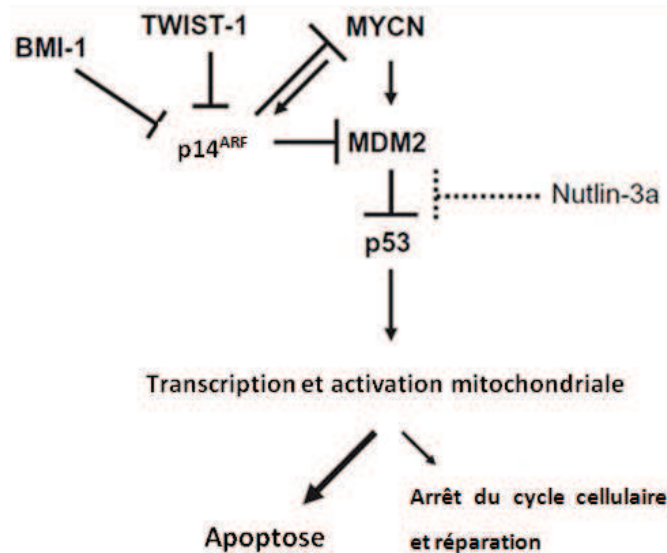


Figure 8. Contrôle de la voie de signalisation p 14^{ARF}/MDM2/p53

Rôle central de la MDM2 dans la prolifération de la cellule tumorale. L'utilisation d'un inhibiteur de cette oncoprotéine comme la Nutlin-3a pourrait être une des nouvelles voies thérapeutiques utilisées dans le traitement du neuroblastome. (D'après Kim et Shohet, 2009)

De plus, l'oncoprotéine MDM2 régule l'expression post-transcriptionnelle de l'oncoprotéine MYCN associée à la croissance des cellules de neuroblastome. L'augmentation cytoplasmique de MDM2 est responsable de l'augmentation conjointe de l'expression de l'ARNm et de la protéine MYCN, en favorisant la stabilité de ces ARNm (Gu *et al.*, 2011).

2-2-3- La protéine kinase Polo-1

La protéine PLK1 est une sérine thréonine kinase spécifique qui favorise la progression du cycle cellulaire en phosphorylant et activant certains effecteurs comme le cdc25c qui est une phosphatase, activant par déphosphorylation le complexe cycline cyclineB/cdc2. Cette protéine kinase est essentielle pour l'entrée en mitose de la cellule après la réparation des dommages de l'ADN ayant provoqué l'arrêt du cycle cellulaire (Mross *et al.*, 2008) et est rencontrée dans de nombreux cancers.

Un niveau élevé d'expression de cette protéine est fortement associée au neuroblastome à haut risque et à un mauvais pronostic entraînant seulement 40 % de survie

chez les enfants possédant un traitement intensif multimodal (Park *et al.*, 2008). Ce facteur prédictif de mauvais résultat est indépendant des autres facteurs pronostics et joue un rôle clé dans la progression des neuroblastomes agressifs (Ackermann *et al.*, 2011). Le développement d'inhibiteurs de la PLK1 constitue une thérapie de choix dans les formes les plus agressives de neuroblastome.

2-2-4- La protéine sauvage p53 induite par le gene 1

Le gène Wig-1 est une cible transcriptionnelle de la protéine p 53 suppressive de tumeurs dans les cellules humaines (Hellborg *et al.*, 2001). Il est fortement exprimé au niveau du système nerveux mais il est présent dans tous les types cellulaires. Il est également plus exprimé dans les cellules souches que dans les tissus différenciés (Vilborg *et al.*, 2011; Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Wig-1 est une *protéine à doigt de zinc (zinc finger protein)* qui se lie préférentiellement à l'ARN double brin qu'à l'ARN simple brin ou à l'ADN simple brin (Mendez Vidal *et al.*, 2006). Cette protéine se trouve essentiellement dans le noyau mais elle peut faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (Vilborg *et al.*, 2009) et elle est hautement conservée au sein des espèces.

Wig-1 était capable de se lier à l'extrémité 3' de l'ARNm de p53 et de le stabiliser en évitant sa dé-adénylation (Vilborg *et al.*, 2009). La région riche en uracile de l'ARNm de p53 est une sous-classe des *éléments riches en adényl et en uracile (AU-rich elements, AREs)*, qui sont des séquences connues pour leur rôle dans la régulation de la stabilité de l'ARNm et de l'efficacité de la traduction (Vilborg *et al.*, 2012). Ces AREs sont généralement trouvés dans les ARNm des gènes dont l'expression est hautement contrôlée. Ils codent pour des protéines impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire ou répondant à des facteurs extérieurs (Audic *et al.*, 2004 ; Barreau *et al.*, 2005).

Les protéines interagissant avec ces domaines ont un rôle crucial dans la régulation, car elles peuvent contrôler le niveau d'ARNm dans la cellule et il a été montré qu'elles avaient un rôle important dans le cancer et son développement (Audic *et al.*, 2004 ; Steinman, 2007). L'ARNm de l'oncogène N-Myc possède des séquences riches en domaine AU. La protéine N-Myc est normalement et principalement exprimée dans les tissus nerveux pendant l'embryogénèse et absente dans les tissus adultes (Vilborg *et al.*, 2012). Wig-1

interagissant avec ces deux protéines, serait une cible potentielle intéressante dans la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Une stratégie thérapeutique basée sur Wig-1 consisterait soit à inhiber spécifiquement la liaison de Wig-1 avec l'ARNm de N-Myc, soit dans une approche plus globale à cibler l'expression de Wig-1 ou sa liaison avec les autres ARNm.

2-2-5- Le neuropeptide Y et son récepteur NY2R

Le NPY est un neuropeptide du système sympathique constitué de 36 acides aminés et est très conservé au sein des espèces. Il intervient dans la régulation de nombreuses fonctions comme la température corporelle ou l'alimentation. Il a été décrit également que ce peptide stimule l'angiogénèse et la prolifération du neuroblastome (Cohen *et al.*, 1990). Ce neuropeptide interagit avec les récepteurs NYR couplés à des protéines G. Le NYP est un facteur de croissance de nombreuses cellules mais plus particulièrement des cellules endothéliales et des précurseurs neuronaux (Lu *et al.*, 2010).

Les patients atteints de neuroblastome possèdent des taux plasmatiques élevés de NYP qui sont corrélés à une amplification de l'oncogène MYCN et à un mauvais pronostic (Dötsch *et al.*, 1998). Le récepteur NY2R est le récepteur le plus fréquemment exprimé par le neuroblastome. Il a été décrit que le blocage du récepteur NY2R provoque une diminution de la prolifération du neuroblastome par induction de l'apoptose et par une fragilisation de la vascularisation de la tumeur. Le blocage de la liaison du NYP avec ce récepteur pourrait être une approche thérapeutique intéressante dans le traitement du neuroblastome. En effet l'utilisation du BIIE0246, un antagoniste du NY2R, inhibe significativement le développement du Neuroblastome dans un modèle de xénogreffe (Malmstrom *et al.*, 2001) Cependant, du fait de son instabilité, cette molécule présente une demi-vie courte, ne dépassant pas les trente minutes. Le rôle des autres récepteurs au NPY exprimés par les cellules neuroblastiques et l'effet d'une thérapie bloquant ces différents sous-types de récepteurs doit être investigué (Kitlinska *et al.*, 2005).

2-2-6- La protéine cathepsine L

La protéine cathepsine L est une protéase retrouvée et activée à pH acide dans les lysosomes mais également au niveau de la matrice extracellulaire. Cette protéase semble être impliquée dans les processus de perte d'adhésion cellulaire et de digestion de la matrice cellulaire favorisant la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Lankelma *et al.*, 2010). La prolifération excessive des cellules tumorales favorise le processus de glycolyse anaérobie responsable de la formation d'un microenvironnement acide autour de la tumeur. Cet environnement acide est nécessaire pour l'activation de la cathepsine L qui va digérer les composants de la matrices extracellulaire comme le collagène de type I et IV.

La réduction de la dégradation de la matrice extracellulaire par inhibition de la cathepsine L entraînerait une diminution de la migration et de l'invasion des cellules tumorales. De plus la réduction de la cathepsine L contribuerait à une amélioration de l'action et à une diminution de la toxicité de certains agents de chimiothérapie (Lankelma *et al.*, 2010). L'inhibition de la cathepsine L couplée à l'utilisation de la doxorubicine, un intercalant de l'ADN utilisé dans le traitement du neuroblastome, induit la sénescence des cellules du neuroblastome (Zheng *et al.*, 2004). L'inhibition de cette protéase permettrait de stabiliser, d'augmenter la disponibilité de la cible de la molécule et de diminuer la résistance au traitement (Zheng *et al.*, 2009).

2-2-7- L'endosialine

L'endosialine est une protéine codée par le gène CD248 et un membre du groupe IV de la famille des récepteurs transmembranaires aux lectines de type C. Ce récepteur est exprimé à la surface des péricytes, des cellules stromales et des cellules endothéliales dans de nombreuses tumeurs comme le neuroblastome, le cancer du poumon à petites cellules et le mélanome (Rouleau *et al.*, 2011). L'endosialine est exprimée également sur les vaisseaux sanguins irriguant la tumeur dans le neuroblastome, le cancer du poumon à petites cellules et le mélanome et son faible niveau d'expression dans les tissus normaux en font une cible de choix dans la thérapie anti-angiogénique. L'endosialine est exprimée également sur les lignées cellulaires de neuroblastome présentant une amplification de l'oncogène MYCN, à un

stade avancé de la pathologie. La présence de l'endosialine chez ces lignées cellulaires résistantes au traitement met en évidence que l'endosialine est une cible thérapeutique possible pour les neuroblastomes à un stade avancé (Rouleau *et al.*, 2011).

2-2-8- Les récepteurs à la neurotrophine

Les récepteurs NTRK, protéine impliquée dans la survie, la différenciation et les fonctions des neurones, jouent un rôle essentiel dans le développement et le maintien du système nerveux sympathique. Cette famille homologue de récepteurs à la tyrosine kinase est constituée de trois récepteurs TrkA (NTRK), TrkB (NTRK) et TrkC (NTRK3) dont les ligands respectifs sont le NGF, le BDNF, et la NT3 (Brodeur G.M. *et al.*, 2009). Bien que le TrkC soit le récepteur de haute affinité à la NT3, celle-ci peut se lier et activer également TrkA et TrkB. Ces trois récepteurs ont des structures similaires et vont provoquer l'activation de nombreuses voies de signalisation intervenant dans la survie ou la différenciation cellulaire, lorsqu'ils seront activés par fixation de leur ligand (Figure 9).

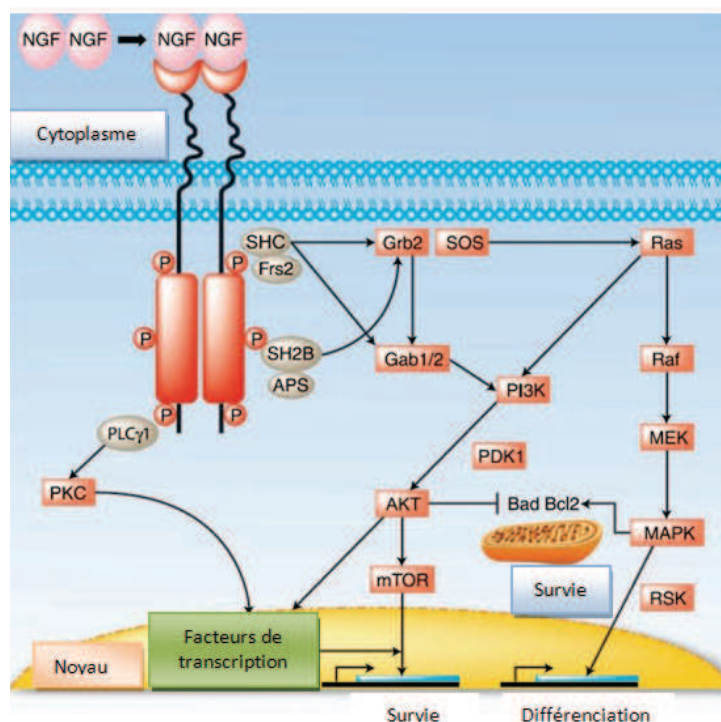


Figure 9. Activation du récepteur Trk A par son ligand NGF

L'activation du récepteur et la phosphorylation de nombreux effecteurs impliqués dans différentes voies de signalisation vont être responsable de la survie ou de la différenciation cellulaire des neuroblastes. (D'après Brodeur *et al.*, 2009).

Un niveau élevé de TrkA a été observé dans les neuroblastomes de pronostic favorable alors que son expression est faible voire absente dans les neuroblastomes à un stade avancé. Le TrkB et son ligand le BDNF sont fortement exprimés dans les neuroblastomes de pronostic défavorable. Son expression dans le neuroblastome est associée à des phénomènes de résistance aux agents anticancéreux et à l'expression de facteurs pro-angiogéniques (Eggert *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2002). L'expression de TrkC est élevée essentiellement dans les neuroblastomes de bon pronostic. Son expression est associée à des tumeurs de stade peu avancée chez un patient très jeune et sans amplification de l'oncogène MYCN (Yamashiro *et al.*, 1996).

Le développement de thérapies spécifiques de ces récepteurs Trk comme l'immunothérapie ou la thérapie génique permettrait l'intégration de ces thérapies dans les différents protocoles utilisés dans le traitement des différents stades de neuroblastome.

2-2-9- La protéine Notch-1

La protéine Notch-1 est un récepteur transmembranaire impliqué dans la voie de signalisation Notch. Cette voie de signalisation joue un rôle important dans le développement embryonnaire en sélectionnant les cellules souches neurales multipotentes, qui se différencieront en neurones et en cellules gliales du système nerveux central et périphérique (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999 ; Morrison *et al.*, 2000). Le rôle proto-oncogène de la voie de signalisation Notch a été démontrée dans de nombreux cancers (Figure 10) comme le neuroblastome, notamment par son implication dans la prolifération cellulaire et l'angiogénèse tumorale (Funahashi *et al.*, 2008). L'activation de la voie Notch dans les cellules de neuroblastome entraîne principalement l'inhibition de la différenciation cellulaire et de la formation des neurites (Grynfeld *et al.*, 2000 ; Levy *et al.*, 2002). Son expression est corrélée à des tumeurs indifférenciées au niveau histologique et comme pour d'autres tumeurs l'augmentation de son expression est prédictive d'un mauvais résultat. Le récepteur constitue une cible intéressante pour le développement de nouvelles molécules dans le traitement du neuroblastome.

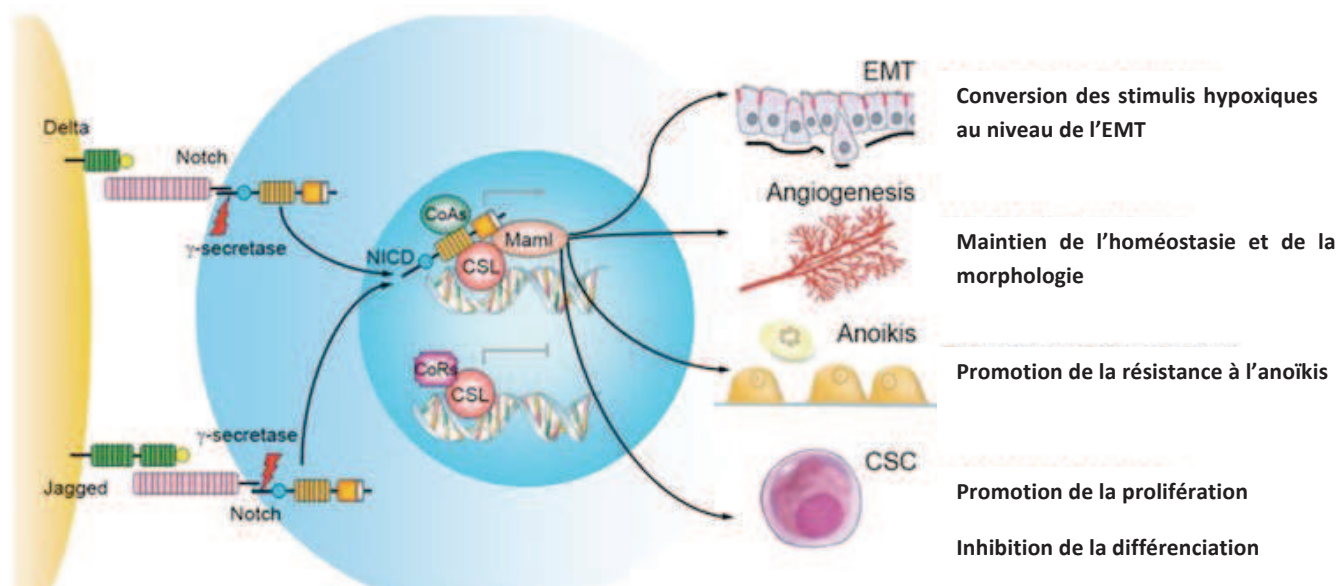


Figure 10. Diverses réponses cellulaires liées à l'activation de la voie de signalisation Notch

(D'après Yi-Yang *et al.*, 2011)

2-3- Les marqueurs gangliosidiques GD2 et GD2-O-acétylé

2-3-1- Le disialoganglioside GD2

Le GD2 est un des sept membres de la famille des disialogangliosides et un glycosphingolipide surexprimé à la surface des cellules tumorales d'origine neuroectodermique comme dans le neuroblastome (Cahan *et al.*, 1982). Dans les tissus normaux, le GD2 est exprimé à l'état de trace à la surface des neurones, des mélanocytes et des fibres nerveuses périphériques (Yuki *et al.*, 1997 ; Schulz *et al.*, 1984). Les anticorps anti-GD2 développés, provoquant la destruction de la tumeur par des réactions de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et de cytotoxicité cellulaire dépendante du complément (CDC) (Zeng *et al.*, 2005; Imai *et al.*, 2005), vont également se fixer sur ces tissus sains et être responsables, par réaction croisée, d'effets indésirables importants comme des douleurs sévères, des modifications du tonus cardio-vasculaire, de la fièvre et une déplétion du complément (Cheung *et al.*, 1987 ; Handgretinger *et al.*, 1992).

2-3-2- Le GD2-O-acétylé

L' OAcGD2 est le dérivé O-acétylé du GD2 sur le carbone C9 de l'acide sialique terminal. Contrairement au GD2, L'OAcGD2 n'est pas exprimé par les tissus sains mais par des tissus tumoraux comme le neuroblastome ou le mélanome (Sjoberg *et al.*, 1992 ; Ye *et al.*, 1992). Le développement de l'immunothérapie spécifique à l'O-acétyl-GD2 permettrait donc potentiellement de limiter la toxicité liée aux anticorps anti-GD2 et par conséquent d'augmenter la posologie chez ces patients atteints de neuroblastome (Alvarez-Rueda *et al.*, 2011).

III- Les nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques

1- Les innovations diagnostiques

1-1- L'imagerie médicale : la tomographie par émission de positons au Fluorine-18-L-dihydroxyphenylalanine- tomographie par ordinateur

La ^{18}F -DOPA-PET est une méthode d'imagerie médicale utilisant le radiopharmaceutique ^{18}F -DOPA. Ce radiopharmaceutique est utilisée dans le diagnostic des tumeurs endocrines digestives bien différenciées. La DOPA est en effet captée, décarboxylée et concentrée dans les granules de sécrétions présents au niveau des lésions endocrines.

Le fluor-18 est un radionucléide possédant une demi-vie de 110 minutes, émetteurs de positons et produit par cyclotron. Après quelques millimètres, le positon se dématérialise avec un électron pour conduire à l'émission simultanée de deux photons d'énergie 511 KeV. Ces photons sont détectés par les caméras du PET comportant de nombreux détecteurs.

Cette technique a été comparée, dans une étude pilote, à la scintigraphie au ^{123}I -*metaiodobenzylguanidine* (^{123}I -MIBG) chez 19 enfants atteints d'un stade 3 ou 4 de neuroblastome (Piccardo *et al.*, 2012). Sur 17 patients où la maladie était confirmée, la maladie a été détectée chez 16 patients avec la ^{18}F -DOPA-PET /CT et 11 avec la scintigraphie au ^{123}I -MIBG. La ^{18}F -DOPA-PET /CT présentait lors de cette étude une sensibilité et une efficacité, respectivement de 95 % et de 96 % alors que pour la scintigraphie au ^{123}I -MIBG, la sensibilité et l'efficacité était respectivement de 68 % et 64 %. Cependant aucune différence significative n'a été observée au niveau de la spécificité de ces deux méthodes d'imageries médicales (Piccardo *et al.*, 2012).

Cette technique d'imagerie semble être une nouvelle opportunité plus sensible et plus efficace pour évaluer et diagnostiquer les enfants atteints de neuroblastome.

1-2- L'analyse génétique

1-2-1- Les polymorphismes nucléotidiques sur une seule base et les puces à ADN

Les SNP représentent la forme la plus abondante de variations génétiques chez les individus et sont caractérisés par la modification d'une seule paire de base au sein d'une séquence nucléotidique. L'une des méthodes les plus efficaces pour repérer ces mutations est l'utilisation de puces à ADN.

Dans cette technique d'analyse génomique, l'ADN des cellules est analysée par hybridation. Les fragments d'ADN sont amplifiés par la technique de PCR et sont déposés sur une lame de polylysine, sur laquelle les ADN déposés vont être fixés et dénaturés. Les ARNm sont extraits des cellules et sont ensuite transformés en ADNc par transcription inverse. Les ADNc provenant des deux cellules sont marqués, l'un avec un fluorochrome vert et l'autre avec un fluorochrome rouge. Les ADN marqués sont mélangés et déposés sur la matrice d'ADN. À 60 °C, les ADN fluorescents vont s'hybrider sur leurs séquences nucléotidiques complémentaires (Figure 11).

Les spots sont excités par un laser et la fluorescence émise est captée par un photomultiplicateur (PMT) couplé à un microscope confocal. Les différences d'expressions d'ADN sont visualisées à partir de logiciels informatiques. Dans le cadre du neuroblastome, GenFlex Tag a développé une puce à ADN contenant 2000 séquences oligonucléotidiques permettant d'identifier 13 régions d'intérêts (Maris *et al.*, 2005).

Cette technique apporte de nombreux avantages comparés aux techniques d'analyse traditionnelle et améliore le diagnostic clinique des patients atteints de neuroblastome. Cette approche flexible utilisant la PCR multiplex, permet un dépistage sensible, rentable et facilement adaptable au contrôle de la pathologie dans diverses maladies (Maris *et al.*, 2005) et permettra dans l'avenir de diagnostiquer plus précocément les enfants atteints de neuroblastome.

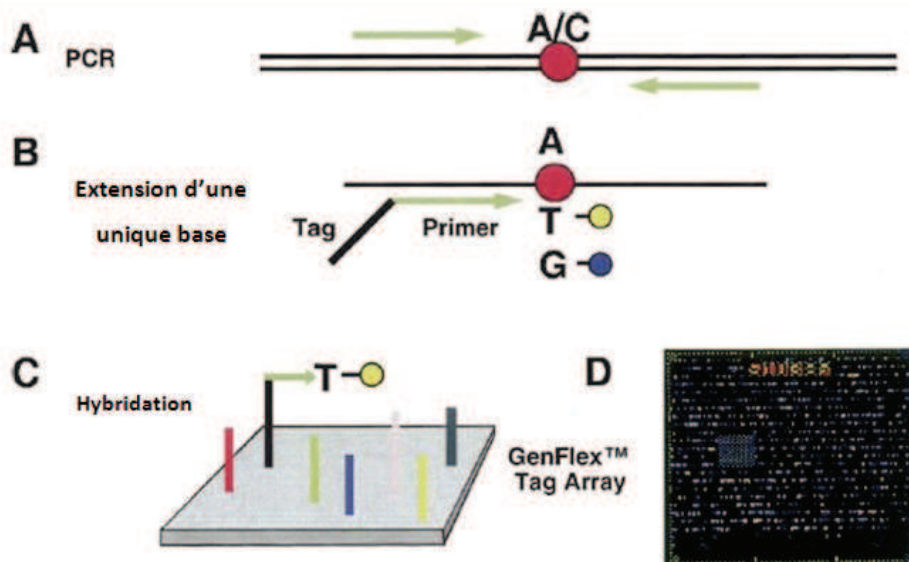


Figure 11. Méthode de préparation des puces à ADN.

La puce à ADN GenFlex™ contient 2050 emplacements de sondes tag permettant d'avoir des caractéristiques d'hybridation similaire. A : L'ADN contenant chaque SNP est amplifié par la méthode de la PCR. B : Les séquences amplifiées sont utilisées comme matrice pour les amorces dans une solution, et l'extension à partir d'une seule base marquée par deux ddNTPs fluorescents différents est réalisée. C : Les produits de l'extension sont capturés par la puce à ADN GenFlex™ par hybridation avec les séquences complémentaires, qui permet jusqu'à l'analyse de 2000 produits d'extension et 50 contrôles. D : La puce est analysé par les fluorescences émises à $\lambda = 530 \text{ nm}$ et $\lambda = 570 \text{ nm}$ et le logiciel permet l'analyse les données génétiques (D'après Maris *et al.*, 2005)

1-2-2- La technique de Fluorescence par Hybridation

De nombreuses amplifications génomiques, translocations de chromosomes et pertes ou gains de segments chromosomiques ont été décrits dans le neuroblastome. Le gain du chromosome 17q, observé dans plus de 50 à 70 % des neuroblastomes ou la délétion du bras court du chromosome 1, observé dans 20 à 30 % des cas, sont des facteurs de mauvais pronostic.

La technique de FISH permet une analyse fine de la structure des chromosomes. Une sonde dénaturée d'ADN s'hybride avec sa séquence spécifique par la formation de liaisons hydrogènes. Les molécules non hybridées sont éliminées par lavage, les hybrides spécifiques sont révélés par immunodétection et l'observation est essentiellement réalisée par un microscope à épifluorescence.

La technique FISH permet de détecter facilement ces anomalies chromosomiques qui sont plus difficilement analysable avec la technique d'analyse cytogénique classique du fait de la qualité médiocre des météphasés obtenues, des index mitotiques faibles ou de la contamination des cellules tumorales par le tissu sain.

Cette méthode d'analyse présente plusieurs intérêts dont un intérêt diagnostique, pour la classification de la tumeur et un intérêt pronostique. En effet, il existe une corrélation forte entre une anomalie chromosomique et un type ou un sous-type de cancer. Il existe également une corrélation entre le type d'anomalie et le degré d'agressivité d'une tumeur.

L'utilisation de la technique FISH dans le diagnostic et le pronostic de formes agressives ou récidivantes chez les enfants atteints de neuroblastome est un outil intéressant permettant l'évaluation de la pathologie et la mise en place de stratégies thérapeutiques précises comme il est précisé dans le tableau ci-dessous (Tableau 8).

Classification Génétique INRG des marqueurs de risques	Techniques recommandées ou acceptées	Sondes ADN recommandées et commentaires
Marqueurs obligatoires MYCN	I-FISH, PCR, aCGH, MLPA	2 couleurs pour l'I-FISH : BAC ou un autre clone d'ADN d'insertion pour le gène MYCN ou un clone de taille similaire pour un gène/locus sur le bras long du chromosome 2 (ex : LAF, 2q11) Les sondes disponibles commercialement doivent être utilisées chaque fois que c'est possible.
11q23	I-FISH, PCR, techniques pan-/multigénomiques : aCGH (oligo, clone ou base SNP), MLPA	
Ploïdie cellulaire	Cytométrie de Flux	Les cellules normales doivent provenir du même patient et sont utilisées comme standard
Marqueurs génétiques à analyser de manière prospective	aCGH, sondes SNP, MLPA	Plateformes disponibles commercialement sont préférées
1p		
2p		
DDX1		
NAG		
ALK		
3p		
4p		
7q		
9p		
12p		
14q		
17q	aCGH, sondes SNP	
Les autres		

Tableau 8. Consensus de marqueurs génétiques couramment utilisés pour la thérapie et pour les stratégies futures

(D'après Ambros et al., 2009)

1-2-3- Visualisation et quantification du mi-RNA 124 dans les cellules de neuroblastome par couplage de la cytométrie de flux avec les sondes à ARN

Le miRNA-124 est présent dans les neurones matures et joue un rôle important dans la différenciation neuronale en ciblant plusieurs gènes (Gao, 2010) dont le gène codant pour la CDK6 intervenant dans la progression du cycle cellulaire dans de nombreuses cellules.

Dans cette méthode d'imagerie par cytométrie de flux, les cellules de neuroblastome sont incubées à 53 °C pendant 30 minutes en présence de sondes miR-124-FITC spécifiques du miRNA-124 ou de sondes miR-FITC non spécifiques. La prolifération des cellules neuroblastiques est évaluée par l'ajout de bromodeoxyuridine et l'expression de la CDK6 par l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CDK6 conjugué également avec un fluorochrome. La quantification des miRNA-124-FITC se fait par cytométrie en flux (Ponomarev *et al.*, 2011).

Cette approche sensitive et quantitative permet l'évaluation de l'expression de mi-RNA dans chaque cellule mais est également utile pour valider l'expression ou non de gènes cibles. L'utilisation de la sonde RNA marquée par fluorescence associée à un anticorps conjugué à un fluorochrome, excité par différents lasers permet une bonne séparation du signal avec peu d'effets parasites sur l'ensemble du signal fluorescent (Ponomarev *et al.*, 2011). Cette technique pourra être appliquée dans l'avenir pour d'autres mi-RNA ou gènes cibles spécifiques du neuroblastome.

1-2-4- Détection de la maladie résiduelle par RT-PCR

La détection de la maladie résiduelle est l'un des problèmes majeurs dans le neuroblastome. En effet, chez de nombreux patients, le diagnostic de rechute est tardif et établi à l'aide des techniques d'imageries médicales. La mise en place de marqueurs permettant la détection de la maladie résiduelle à un stade précoce est un enjeu majeur dans la thérapie du neuroblastome. La détection de l'expression de marqueurs par RT-PCR comme la tyrosine hydroxylase, le gène permettant l'expression de la protéine neuroendocrine 9.5, et la GD2-synthétase, a été réalisée sur des échantillons de moëlle osseuse hématopoïétique et de sang périphérique par l'équipe du Pr. Suzuki.

La thyrosine hydroxylase semblerait être le marqueur le plus spécifique et le gène permettant l'expression de la protéine neuroendocrine 9.5 le plus sensible, en permettant la détection d'une cellule positive parmi 10^7 cellules négatives, pour le diagnostic de ces formes de neuroblastome (Ootsuka *et al*, 2008). Ces marqueurs doivent encore faire l'objet de recherche et d'études mais représentent un outil diagnostique potentiellement intéressant dans l'évaluation de la maladie résiduelle.

2- Les thérapies innovantes

Dans ce chapitre seront présentés essentiellement les molécules ou protocoles en phase III clinique dans le neuroblastome. Le processus angiogénique, la néoangiogénèse tumorale, les différentes cibles thérapeutiques et les essais cliniques sur les thérapies anti-angiogénique seront également abordés, contrairement aux autres molécules ou thérapies comme les inhibiteurs de l'ALK ou les miRNA actuellement en phase I ou II des études cliniques.

2-1- Les radiopharmaceutiques : le ^{131}I -metaiodobenzylguanidine

L'I-MIBG est un analogue aralkylguanidine de la norépinephrine qui a été développé pour visualiser l'origine du tissu nerveux sympathique et est devenu un outil essentiel pour évaluer le stade du neuroblastome et la réponse au traitement (Figure 12).



Figure 12. Structure chimique de la norépinéphrine et de la métaiodobenzylguanidine

(D'après Matthay *et al.*, 2012)

Une étude rétrospective a été réalisée sur l'intérêt du ^{131}I -MIBG dans le traitement des formes à haut risques de neuroblastome. Le ^{131}I -MIBG a été administré à 40 enfants sur les 111 présentant un neuroblastome de stade 4 et âgé de plus de 1 an et à une dose de 0,44 GBq/kg. Ces enfants présentaient une maladie résiduelle, évaluée par ^{123}I -MIBG, après une chimiothérapie d'induction complète.

Les 40 enfants traités au ^{131}I -MIBG avaient un EFS à 3 ans supérieur au groupe non traité avec le ^{131}I -MIBG, respectivement 46 +/- 8 % et 19 +/- 5 % et un taux de survie à 3 ans également supérieur, respectivement 58 +/- 9 % et 43 +/- 6 %. Cependant un sous groupe de 66 patients soumis à des doses élevées de chimiothérapie avec une transplantation de cellules souches autologues durant le traitement, présentent des résultats similaires avec ou sans ^{131}I -MIBG, avec une EFS à 3 ans respectivement de 49 +/- 9 % et 33 +/- 9 % , et un taux de survie à 3 ans respectivement de 59 +/- 10 % et 59 +/- 9 % (Schmidt M. *et al*, 2006). Des essais cliniques de phase I et II ou des essais pilotes utilisant le ^{131}I -MIBG à des doses différentes ou combiné avec des agents cytotoxiques sont actuellement en cours pour améliorer l'efficacité de ce traitement potentiel.

2-2- Anticorps thérapeutique: l'anticorps monoclonal ch14.18 associé au facteur stimulant les colonies de granulocytes et des macrophages, l'Interleukine 2 et l'isotrétinoïne

Parmi les autres essais cliniques de phase III, l'association de l'anticorps chimérique ch14.18, déjà développé, avec le GM-CSF, IL-2 et l'isotrétinoïne à 100 mg/m² a été comparée à l'isotrétinoïne seule aux Etats-Unis (Yu *et al.*, 2010). Un essai clinique est également réalisé en Europe mais sans l'isotrétinoïne et le GM-CSF, molécules interdites en Europe. Cette étude a été réalisée sur 226 enfants à haut risque de neuroblastome, ayant subi une thérapie myéloablative avec récupération des cellules souches, et recevant 6 cycles d'isotrétinoïne seule ou 6 cycles d'isotrétinoïne avec 5 cycles concomitant de ch14.18 en alternant le GM-CSF et IL-2.

Les 113 enfants recevant l'immunothérapie ont une EFS à 2 ans significativement améliorée, 66 % ± 5 %, P = 0,01, par rapport aux enfants traités avec l'isotrétinoïne, 46 % ± 5 %, P = 0,01. Le taux de survie à 2 ans est de 86 % ± 4 % pour les enfants recevant cette immunothérapie combinée à l'isotrétinoïne alors qu'il est de 75 % ± 5 %. Bien que ce

nouveau protocole améliore le pronostic des enfants atteints de neuroblastome à haut risque, le traitement présente une toxicité non négligeable, plus particulièrement avec les cycles d'IL-2 (Yu *et al.*, 2010).

2-3- Les protocoles de combinaison de chimiothérapie associé à la chirurgie, l'immunothérapie et la transplantation de cellules souches

2-3-1- Les combinaisons de chimiothérapie associée la chirurgie avec ou sans l'isotrétinoïne dans le traitement des jeunes atteints de neuroblastome

Un des objectifs du COG, en collaboration avec l'institut national du cancer est de déterminer les meilleurs protocoles de traitement du neuroblastome et notamment les différents schémas de chimiothérapie. Au cours de cet essai de phase III, différents schémas de chimiothérapie combinée à la chirurgie avec ou sans l'isotrétinoïne ont été testés pour déterminer l'efficacité de ces différents protocoles (clinicaltrials.gov, numéro NCT00499616).

464 patients de moins de 12 ans ont été inscrits à cette étude qui a débuté en juillet 2007. Le premier protocole est constitué de carboplatine, cyclophosphamide, chlorhydrate de topitécan et étoposide. Dans les trois autres groupes, le chlorhydrate de doxorubicine est ajouté à ces quatre agents administrés par voie intraveineuse (iv). Le nombre de cycle initial de chimiothérapie, l'administration ou non de l'isotrétinoïne varie dans ces trois derniers groupes.

2-3-2 La transplantation de cellules souches associé à l'immunothérapie et à l'isotrétinoïne dans le traitement du neuroblastome

Le développement de nouveaux protocoles thérapeutiques utilisant la transplantation de cellules souches dans les formes les plus graves de neuroblastome sont en cours d'évaluation. L'efficacité de la chimiothérapie associée ou non avec l'anticorps monoclonal ch.14.18, suivi de l'administration d'IL-2 et de la sargramastin après la transplantation n'est pas connue et est actuellement évaluée (clinicaltrials.gov, numéro NCT00026312).

1150 patients de moins de trente ans sont séparés en deux groupes dont l'un est traité exclusivement avec de l'isotrétinoïne et le deuxième avec l'anticorps ch.14.18, l'isotrétinoïne, l'aldesleukin et la sargramostin. L'évaluation de l'efficacité ou non de ce protocole se réalise par la mesure de la survie sans événement.

2-4- L'angiogénèse

2-4-1. L'angiogénèse tumorale

L'angiogénèse se produit pendant le développement embryonnaire et le remodelage vasculaire. Elle contrôle une série d'évènements qui vont conduire à la néovascularisation des tissus (Carmeliet et Jain, 2011). Les vaisseaux sanguins et les composants du stroma sont sensibles aux facteurs pro-angiogéniques qui permettent le remodelage vasculaire pendant le développement, la cicatrisation des plaies et la grossesse (Weis et Cheresh, 2011). Cependant dans des situations pathologiques telles que le cancer, ces mêmes voies de signalisations responsables de l'angiogénèse sont activées et permettent dans un premier temps la réoxygénation des zones tumorales hypoxiques, favorisant son développement, puis dans un deuxième temps la dissémination des métastases.

Le microenvironnement tumoral est composé de plusieurs types de cellules qui vont favoriser la néoangiogénèse tumorale. Quand le diamètre de la tumeur excède quelques millimètres (2-3 mm³), l'hypoxie et la privation de nutriments vont entraîner une activation de l'angiogénèse, qui va permettre le développement de la tumeur. Les cellules tumorales exploitent ce microenvironnement pour relarguer des cytokines et des facteurs de croissance qui activent les cellules quiescentes autour d'elles et initient une cascade d'évènement qui est rapidement dérégulée (Figure 13).

Les cellules tumorales vont libérer des facteurs pro-angiogénique comme par exemple le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) qui va stimuler la néoangiogénèse tumorale et la prolifération des cellules endothéliales. Bien que cette induction de l'angiogénèse puisse permettre initialement à la tumeur d'avoir accès à plus de nutriments et d'oxygène, le réseau sanguin formé est faible et tortueux, provoquant un flux sanguin irrégulier au sein de la tumeur et par conséquent une réponse partielle à ces besoins mais également une

résistance aux traitements chimiothérapeutiques et radiothérapeutiques (Weis et Cheresch, 2005).

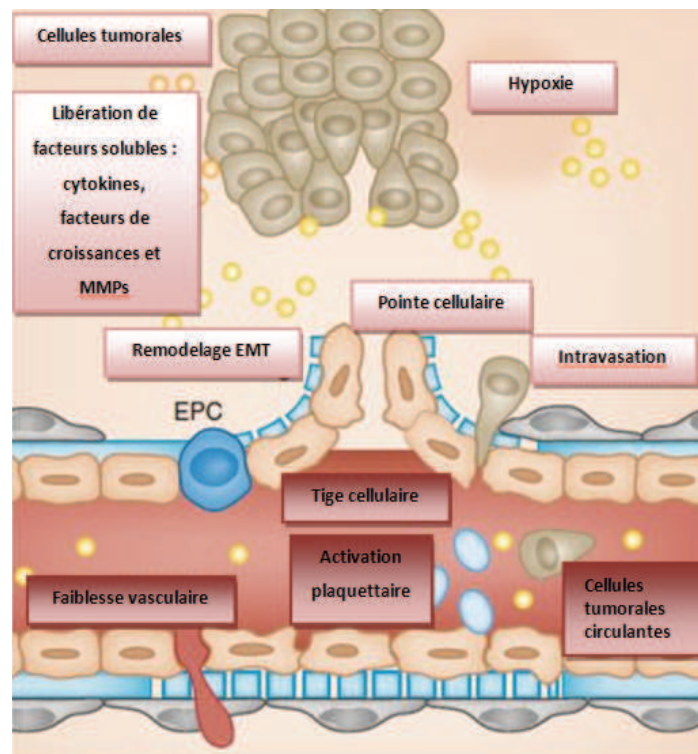


Figure 13. La néo-angiogenèse

La combinaison de signaux stimulants à l'intérieur de la tumeur provoque le changement des différents types cellulaires. Les cellules périvasculaires vont se détacher des vaisseaux sanguins matures, compromettant leur intégrité, permettant leur remodelage et la promotion d'un phénotype activé. Une fois la barrière vasculaire endommagée, les différents types de cellules sont exposés au stimuli inflammatoire et pro-angiogénique permettant l'amplification du processus angiogénique. (D'après Weis et Cheresch, 2011)

2-4-2. L'angiogenèse et sa régulation dans le neuroblastome

De nombreux mécanismes ont été décrits dans la néoangiogenèse du neuroblastome. En effet, l'implication de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF-A, bFGF et l'Ang dans la formation de néovaisseaux à partir de vaisseaux sanguin ont été reporté (Fotsis et al., 1999 ; Eggert *et al.*, 2000 ; Rössler *et al.*, 1999). La présence d'une amplification de l'oncogène MYCN au niveau des cellules endothéliales formant les microvaisseaux irrigant la tumeur a été décrite récemment et provient des cellules tumorales de neuroblastome. Cette amplification au niveau des cellules endothéliales met en évidence l'existence d'un

“mimétisme vasculaire” par un autre mécanisme que l’angiogénèse (Pezzolo *et al.*, 2007). L’ensemble des mécanismes impliqués dans l’angiogénèse du neuroblastome sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 9).

Neuroblastome	Angiogénèse	Référence
<i>Risque faible :</i>		
- Histologie favorable avec présence de cellules de Schwann	- Expression élevée d'activine A	Schramm <i>et al.</i>
- Expression de Trk- A	- Diminution de l'expression des facteurs angiogéniques	Eggert <i>et al.</i>
<i>Risque élevé :</i>		
- Histologie défavorable avec un Stroma pauvre en cellules de Schwann	- Index vasculaire élevé	Meitar <i>et al.</i>
- Amplification MYCN	- Niveau élevé de VEGF-A, VEGF-B, bFGF, PDGF-A, TGF- α	Eggert <i>et al.</i>
	- Diminution des inhibiteurs de la croissance des cellules endothéliales	Fotsis <i>et al.</i>
- Expression de Trk-B	- Augmentation du niveau de MMP-2 et MMP-9	Ribatti <i>et al.</i>
	- Expression plus élevée des intégrines $\alpha\beta 3$ et $\alpha\beta 5$	

Tableau 9. Corrélation entre les facteurs pro-angiogéniques et les facteurs de risques du neuroblastome.

(D’après Rössler *et al.*, 2008)

Parmi ces facteurs intervenant dans l’angiogénèse du neuroblastome, un grand nombre est impliqué dans le pronostic de la pathologie. Une corrélation entre l’augmentation de l’indice vasculaire et la dissémination des métastases, une amplification de MYCN et des facteurs histologiques défavorables a été décrite. De nombreuses analyses ont confirmé le rôle important de la vascularisation tumorale dans le pronostic de la maladie (Rössler *et al.*, 2008). Par conséquent la néoangiogénèse tumorale semble jouer un rôle crucial dans les différents phénotypes cliniques observés chez les patients atteints de neuroblastomes mais également au niveau de la biologie de la tumeur.

Plusieurs facteurs pro-angiogéniques ont également une valeur pronostique dans le neuroblastome. Il a été observé des taux élevés levels de VEGF-A, VEGF-B, bFGF, Ang-2, TGF-alpha et de PDGF-A dans les stades avancés alors que leur niveau d’expression est faible chez les enfants atteint d’un stade I, II ou IV S de neuroblastome (Eggert *et al.*, 2000). Des MMP et plus particulièrement les MMP-2 et MMP-9 sont associées au processus d’invasion et de dissémination des métastases dans de nombreux cancers. Le niveau d’expression de ces deux MMP est également augmenté dans le neuroblastome et l’expression élevée de MMP-2 est associée à un mauvais pronostic (Rössler *et al.*, 2008). Les intégrines

alpha(v)beta3 et alpha(v)beta5 sont fortement exprimées au à la surface des microvaisseaux irrigant les tumeurs chez les patients à haut risque de neuroblastome contrairement à ceux à faible risque (Erdreich-Epstein *et al.*, 2000). Les mécanismes impliqués dans la dérégulation de l'expression de ces facteurs pro-angiogéniques dans le neuroblastome sont actuellement étudiés.

L'oncogène MYCN est fréquemment amplifié chez les enfants à risque élevé de neuroblastome et est associé également à un indice vasculaire élevé et à un mauvais pronostic (Meitar *et al.*, 1996). Cependant une corrélation directe entre la surexpression de cet oncogène et des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF ou les MMP n'a pas été encore établie (Rössler *et al.*, 2008). Néanmoins des études récentes ont mis en évidence que la surexpression de MYCN dans le neuroblastome agressif est responsable de la suppression de l'expression de trois inhibiteurs de l'angiogénèse (Fostis *et al.*, 1999), et plus particulièrement de l'activine A qui inhibe la croissance et l'angiogénèse tumorale *in vivo* et *in vitro* (Breit *et al.*, 2000). Cette protéine est hautement exprimée dans les Neuroblastomes différenciés et sa surexpression est corrélée à un bon pronostic (Schramm *et al.*, 2005).

La présence des cellules de Schwann quiescentes dans un stroma riche est souvent observée dans les neuroblastomes à risque faible et à bon pronostic (Ambros *et al.*, 1996). Les cellules de Schwann produisent de nombreux inhibiteurs de l'angiogénèse tumorale comme des inhibiteurs à la MMP-2 (Cañete *et al.*, 2000) ou à la PEDGF (Crawford *et al.*, 2001). La présence de ces cellules avec un stroma riche régule négativement l'angiogénèse tumorale et inhibe le développement tumoral observé dans la majorité des Neuroblastomes à faible risque.

Un environnement hypoxique induit un stress cellulaire qui peut conduire rapidement à l'activation de mécanismes cellulaires permettant l'adaptation de la cellule à cet environnement et sa survie. Des gènes cibles comme le gène VEGF-A sont transcrit rapidement par l'intermédiaire du facteur de transcription HIF-1 afin de favoriser la néoangiogénèse (Rössler *et al.*, 2008). Cette surexpression du VEGF-A permet la prolifération des cellules endothéliales intratumorales (Rössler *et al.*, 1999) et la formation d'un réseau sanguin fragile et poreux au niveau de la tumeur. L'hypoxie des cellules tumorales, due à leur prolifération rapide, est un régulateur essentiel de l'angiogénèse tumorale et est responsable de l'activation de voies de signalisations cellulaires impliquées dans ce processus.

Le neuroblastome est une maladie rare et orpheline touchant 150 enfants par an en France. Dans plus de la moitié des cas la maladie est diagnostiquée au stade métastatique et 60 % des enfants rechutent et décèdent. Par conséquent, il est nécessaire d'identifier des marqueurs plus spécifiques et plus sensibles pour permettre une prise en charge plus précoce des ces patients mais également développer de nouvelles thérapies pour les patients diagnostiqués tardivement et pour lesquels aucun traitement efficace n'est proposé. Les thérapies anti-angiogéniques ciblent l'angiogénèse tumorale, étape préliminaire à la dissémination métastatique. Ces thérapies innovantes agissant à un stade tardif du développement tumoral sont intéressantes chez ces patients diagnostiqués au stade IV et peuvent représenter une des thérapies futures dans la prise en charge de ces patients.

**Deuxième Partie. Stratégie anti-
angiogénique et nouvelle cible
thérapeutique : le globoside Gb3**

1- Les stratégies anti-angiogéniques

Les molécules anti-angiogéniques permettent le ciblage de la vascularisation tumorale et l'inhibition de la formation des métastases qui sont des étapes essentielles dans l'invasion tumorale, l'un des paramètres les plus péjoratifs de la maladie. Les molécules anti-angiogéniques interagissent avec les voies d'activation de la néo-angiogénèse tumorale et peuvent ainsi agir de différentes manières comme **l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales**, la neutralisation des facteurs pro-angiogéniques, l'inhibition de la migration des cellules endothéliales, ou en tant qu'inhibiteurs endogènes de l'angiogénèse comme l'endostatine.

1-1- Les anti-angiogéniques sur le marché

Au premier rang des molécules anti-angiogéniques validés en clinique (Tableau 10) vient un anticorps humanisé de classe IgG1 se liant aussi bien *in vitro* que *in vivo* au VEGF-A, l'Avastin[®] ou Bevacizumab. Approuvé par la FDA en 2004, c'est le seul anticorps monoclonal approuvé en première ligne de traitement anti-angiogénique.

Trois autres anticorps bloquant les récepteurs aux facteurs pro-angiogéniques sont également utilisés. Le cétuximab et le panitumumab bloquent le récepteur à l'EGF. Enfin quatre inhibiteurs des récepteurs à la tyrosine kinase possèdent également une activité anti-angiogénique : l'imatinib (Glivec[®]) et l'erlotinib (Tarceva[®]) bloquent spécifiquement l'activité kinase Bcr-Abl et du récepteur à l'EGF respectivement, alors que le sorafenib (Nexavar[®]) et le sunitinib (Sutent[®]) sont des inhibiteurs de tyrosine-kinase multi-cibles, donc moyennement spécifiques des domaines kinases des trois récepteurs au VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3) et le récepteur au PDGF.

Une autre molécule possède une activité anti-angiogénique : le thalidomide. Le thalidomide est un dérivé de l'acide glutamique qui a été prescrit aux femmes enceintes dans les années 60, responsable de malformations de 12000 nouveaux-nés.

Nom	Mécanismes d'action	Cibles moléculaires	Types de cancer	Phase
Bevacizumab (Avastin[®])	Anti-angiogéniques	AcM anti-VEGF	- Cancer colorectal métastatique (+Fluoropyrimidine) - Cancer du sein métastatique (+paclitaxel ou docetaxel) - Cancer du poumon non à petites cellules (+ sels de platine) - Cancer du rein avancé et/ou métastatique	Approuvé Approuvé Approuvé Approuvé
Cetuximab (Erbix[®])	Antagoniste de l'EGF	AcM anti-EGFR	- Cancer métastatique du colon et du rectum	Approuvé
Panitumumab (Vectibix[®])	Antagoniste de l'EGF	AcM anti-EGFR	- Cancer colorectaux métastatiques - Cancer du poumon à non petites cellules - Cancer de la prostate - Cancers pancréatiques et œsophagiens	Approuvé Phase II Phase II Phase I
Trastuzumab (Herceptine[®])	Antagoniste de l'EGF (forme mutée et hyper exprimée du Rc à l'EGF)	AcM anti-CerbB2	- Cancer du sein métastatiques	Approuvé
Imatinib (Glivec[®])	Molécules inhibitrices de tyrosine kinase	Protéine kinase Bcr-Abl	- Leucémie chronique myéloïde (+ interféron)	Approuvé
Erlotinib (Tarceva[®])	Molécules inhibitrices de tyrosine kinase	Rc à l'EGF	- Carcinomes épithéliaux (+ docetaxel) - Cancer du poumon non à petites cellules (+chimiothérapie)	Phase II Approuvé
Sorafenib (Nexavar[®])	Molécules inhibitrices de tyrosine kinase	VEGFR1,2 et 3 PDGFR, c-kit	- Carcinomes rénaux et hépatocarcinome - Carcinomes rénaux (+IL-2) - Cancer du poumon à petites cellules (+docetaxel +carboplatine)	Approuvé Phase II Phase II
Sunitinib (Sutent[®])	Molécules inhibitrices de tyrosine kinase	VEGFR1,2 et 3 PDGFR	- Carcinomes rénaux métastatiques/ cancers gastro-intestinaux - Cancers colorectaux (+ folfox)	Approuvé Phase I
Thalidomide	Anti-angiogéniques	Inhibition libération TNF- α par monocytes	- Myélome multiple - Glioblastome	Phase III Phase II

Tableau 10. Molécules anti-angiogéniques approuvées

(D'après Khosravi Shahi et Fernandez Pineda, 2008 ; Fayette *et al.*, 2006 et le site <http://clinicaltrials.gov>, 2010)

1-2- Les anti-angiogéniques en développement clinique

Une autre stratégie anti-angiogénique consiste à inhiber la migration des cellules endothéliales en empêchant leur interaction avec la matrice extracellulaire. Ainsi, un second anticorps humanisé est en développement, le vitaxin (MEDI-522 ou Abergrin[®]) qui se lie à l'intégrine $\alpha\beta3$ qui est surexprimée au niveau l'endothélium vasculaire de nombreuses tumeurs (Brooks *et al.*, 1994). Un anticorps monoclonal chimérique de classe IgG1, l'IMC-1121B dirigé contre le VEGFR-2, bloque le lien entre ce récepteur et son ligand. (clinicaltrials.gov).

Il existe également des protéines de fusion, qui sont protéines artificielles constituées d'un fragment protéique (épitope, récepteur) d'intérêt associé au fragment Fc d'une immunoglobuline. Le VEGF-Trap (Aflibercept[®]) est une protéine de fusion qui associe le récepteur artificiel au VEGF au fragment Fc d'une immunoglobuline. Il se lie au VEGF circulant ou tissulaire et l'inactive. Son affinité pour le VEGF est 100 fois supérieure à celle obtenue avec des anticorps monoclonaux tout en conservant un profil pharmacocinétique similaire.

De multiples molécules inhibitrices sont actuellement le développement clinique comme le géfitinib (Iressa®) qui cible l'EGF-R ; l'AE-941 (Néovastat®) qui cible le VEGF-1 et les métalloprotéases MMP-2, MMP-9 et MMP-12 ; le vatalanib qui cible le VEGFR-2 et également à plus forte concentration le PDGF-R et c-kit ; le vandetanib qui est un inhibiteur potentiel du VEGF-R et dans une moindre mesure l'EGF-R. Toutes ces molécules sont actuellement en phase d'essais cliniques dans de multiples cancers (Tableau 11).

Nom	Mécanismes d'action	Cibles moléculaires	Types de cancer	Phase
Vitaxin (Abergrin®)	Inhibiteurs des molécules d'adhésion	AcM anti-intégrine $\alpha v\beta 3$	- Mélanome	Phase II
			- Prostate (+ docetaxel, prednisone, et acide zoledronique)	Phase II
			- Cancer du rein (+ Avastin®)/ Psoriasis	Phase II
IMC-1121-B	Antagoniste du VEGF	VEGFR	- Cancer colorectal métastatique - Cancer colorectal métastatique (+ 5-FU/FA et oxaliplatine)	Phase I Phase II
VEGF Trap (Aflibercept®)	Antagoniste du VEGF	VEGF	- DLMA	Phase II
			- Lymphome non-hodgkinien (+ R-CHOP)	Phase II
			- Cancers de la thyroïde	Phase II
Vandetanib (Zactima®, ZD6474)	Molécules inhibitrice de tyrosine kinase	VEGF-R et EGF-R	- Cancer du poumon (+ docetaxel et carboplatine)	Phase II
PKT 787 (Vatalanib)	Antagoniste du VEGF	VEGF-R2 (PDGFR, c-kit)	- Tumeurs neuroendocrines métastatiques	Phase II
AE-941 (Neovastat®)	Inhibiteur des métalloprotéinases	MMP-2,9 et 12, et VEGFR-1	- Myélome multiple/cancer du rein	Phase II
			- Cancer du sein et colorectal (+ chimiothérapie et radiothérapie)	Phase III
Géfitinib (Iressa®, ZD1839)	Molécules inhibitrices de tyrosine kinase	EGF-R	- Cancer de la tête et du cou	Phase I
			- Cancer du poumon à petites cellules	Phase II
			- Carcinomes rénaux (+ sunitinib)	Phase II

Tableau 11. Les molécules anti-angiogéniques en phase d'essais cliniques

(D'après Khosravi Shahi et Fernandez Pineda, 2008 ; Fayette *et al.*, 2006 et le site <http://clinicaltrials.gov>, 2010)

1-3- Les limites des molécules à activité biologique

Les effets des médicaments anti-angiogéniques sont souvent utilisés et amplifiés par leur association au traitement de référence. Cette association entre le traitement de première ligne et l'agent anti-angiogénique s'explique en partie par une synergie mécanistique, les stratégies anti-angiogéniques abaissant les niveaux de protection des cellules endothéliales, qui peuvent du coup s'avérer plus vulnérables aux traitements cytotoxiques.

Malgré leur utilisation, ces traitements présentent parfois peu d'efficacité sur certains types de cancers et présente une toxicité importante lors de leur utilisation. La FDA a intégré

à ses recommandations d'utilisation du bevacizumab, le risque de complication dans la cicatrisation, de perforations intestinales et d'hémorragies, et une augmentation du risque d'hypertension, de thromboembolie et de complications cardio-vasculaires pour les patients prédisposés (Boehm *et al.*, 2010). On ne dispose pas du recul nécessaire pour savoir si ces traitements s'accompagnent d'effets à long terme, mais des modèles murins montrent qu'une inhibition à long terme du VEGF peut conduire à une dégénérescence des neurones moteurs (Carmeliet et Jain, 2000) et nécessite donc une observance.

2- Le Globoside Gb3

2-1- Structure

Le Gb3 est un glycosphingolipide neutre constitué d'un céramide ancré dans la membrane plasmique cellulaire et d'une chaîne oligosaccharidique constituée d'une molécule de glucose associé à deux molécules de galactose (Figure 14).

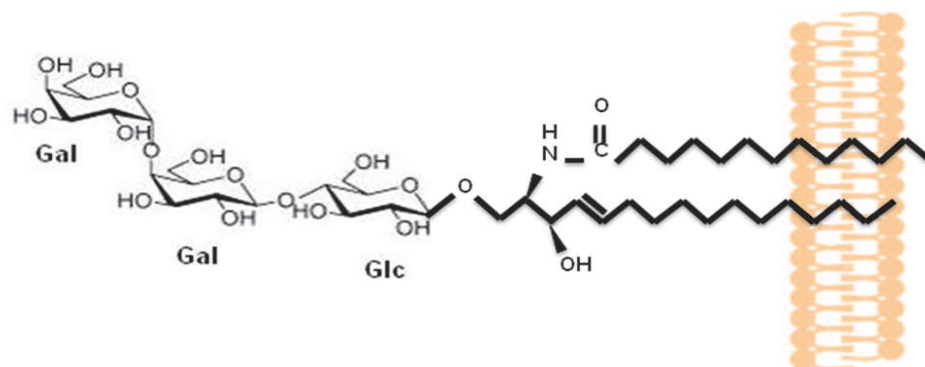


Figure 14. Structure chimique du récepteur Gb3

La structure de ce glycosphingolipide est hautement conservée entre les espèces mais peut cependant présenter des différences au niveau du céramide. Sa chaîne d'acide gras peut varier entre 16 et 24 carbones et présenter des variations au niveau du degré d'insaturation. La structure de la sphingosine reste constante (d18 :1). Dans les tissus tumoraux, le nombre de carbones peut être modifié et des phénomènes d'hydroxylation au

sein de la chaîne oligosaccharidique peuvent se produire, modifiant ainsi les propriétés biologiques de ces structures.

2-2- Métabolisme du Gb3

2-2-1- Voie de biosynthèse du Gb3

La synthèse du Gb3 est sous le contrôle du gène de la Gb3 synthétase, lequel code pour la synthèse d'une enzyme, la lactosylcéramide α 1,4-galactosyltransférase (Keusch *et al.*, 2000 ; Kojima *et al.*, 2000 ; Steffensen *et al.*, 2000). La biosynthèse du Gb3 est initiée par l'ajout d'un glucose par la glucosylcéramide synthétase (GlcCer), formant le motif glucose-céramide (Ichikawa *et al.*, 1998 ; Sprong *et al.*, 1998). Le galactose est ensuite additionné sur ce motif GlcCer par la β -1,4-galactosyltransférase dans la lumière de l'appareil de Golgi pour former le lactosylcéramide (Lannert *et al.*, 1998 ; Won *et al.*, 2007). Le Gb3 est synthétisé par la α 1,4-galactosyltransférase qui rajoute une molécule de galactose sur le lactosylcéramide (Okuda *et al.*, 2006). Les molécules de Gb3 formés sont ensuite transportées par les vésicules golgiennes vers la membrane cellulaire où ils vont participer à la formation des radeaux lipidiques.

2-2-2- Implication du Gb3 dans les maladies métaboliques

Les glycosphingolipides présents au niveau de la membrane plasmique sont régulièrement dégradés par la cellule. Pour être dégradés, ils doivent être internalisés par endocytose jusqu'aux endosomes. De là, une partie des glycosphingolipides peut être recyclée et réinsérée dans la membrane plasmique tandis que la majeure partie sont dégradés dans les lysosomes. Une autre partie peut rejoindre l'appareil de Golgi pour leur synthèse *de novo* (Schwarzmann et Sandhoff, 1990).

Le catabolisme joue un rôle important puisque plusieurs maladies neurodégénératives sont dues à des déficiences dans le catabolisme de certains glycosphingolipides, entraînant leur accumulation dans la cellule (Brady, 1978). Dans le cas

de la maladie de Fabry, une déficience de l'α-galactosidase A et une accumulation de Gb3 cellulaire est observée entraînant des douleurs, des troubles cardiaques et rénaux ainsi qu'une atteinte de la cornée et de la cataracte.

2-3- Distribution du Gb3

2-3-1- Distribution tissulaire

L'expression et le métabolisme des glycolipides, incluant le Gb3, est modifiée au cours de l'oncogénèse. Le récepteur Gb3 est surexprimé dans de nombreuses lignées tumorales comme les tumeurs colorectales, les cancers du pancréas ou du sein (Johansson *et al.*, 2009 ; Falguières *et al.*, 2008 ; Distler *et al.*, 2009). Il est également exprimé à la surface des cellules du lymphome de Burkitt comme CD77 ou surexprimé au niveau des cellules endothéliales intratumorales lors de l'angiogénèse tumorale.

Au niveau des tissus sains, le Gb3 est exprimé par les cellules dendritiques mais également par les cellules du néphron chez le jeune enfant. Il est exprimé également comme antigène du groupe sanguin rare p^K.

2-3-2- Distribution cellulaire

Au niveau cellulaire, les glycosphingolipides sont majoritairement présents dans le feuillet externe de la membrane plasmique (Macher et Sweely, 1978). Certains peuvent être également retrouvés au niveau du cytoplasme (Gillard *et al.*, 1991).

Au niveau de la membrane plasmique, les glycosphingolipides sont regroupés en microdomaines dans les radeaux lipidiques. Ces radeaux lipidiques sont riches en cholestérol et en protéines particulières comme les protéines membranaires liées au GPI (protéine à pied d'ancrage glycosyl-phosphatidylinositol) ou des protéines à long domaines transmembranaires impliquées dans la signalisation cellulaire. Dans le cas de la maladie de Fabry, les taux de cholestérol diminuent au profit du Gb3 au niveau de ces domaines, entraînant des dysfonctionnements de l'endothélium observés dans cette pathologie (Shu et Shayman, 2007).

2-4- Fonctions biologiques du Gb3

En dehors de son rôle de récepteur biologique aux toxines bactériennes de la famille des Shiga toxines ou vérotoxines, les fonctions biologiques du récepteur Gb3 demeurent encore hypothétiques. L'expression du Globoside Gb3 est fortement corrélée à l'envahissement tumoral et au potentiel métastatique dans le cancer colorectal, due à la surexpression de la Gb3 synthétase lors du passage du stade non invasif au stade invasif de la tumeur (Kovbasnjuk *et al.*, 2005). Dans certaines tumeurs comme le neuroblastome, le Gb3 n'est exprimé qu'au niveau de la vascularisation tumorale, ce qui laisse suggérer que l'activation de l'angiogénèse tumorale peut résulter de l'induction de l'expression des cellules endothéliales activées (Lingwood *et al.*, 1999).

3- Les travaux du laboratoire avant mon arrivée

Avant mon arrivée au laboratoire dans l'équipe, un anticorps monoclonal, le 3E2, spécifique du glycolipide neutre Gb3 a été caractérisé. Cet anticorps a été obtenu par immunisation de souris par des cellules endothéliales humaines. Le laboratoire a montré que le Gb3 est surexprimé sur les cellules endothéliales en prolifération par rapport aux cellules endothéliales quiescentes. Ils ont également observé que cet anticorps est efficace en inhibant la prolifération des cellules endothéliales *in vitro*, l'angiogénèse avec un modèle *ex vivo* d'anneau aortique, et la croissance tumorale sur un modèle syngénique murin de neuroblastome. Cet anticorps est capable d'inhiber la prolifération des cellules endothéliales en l'absence de recrutement d'effecteurs du système immunitaire. De plus, ces effets anti-prolifératifs ne résultent pas de l'apoptose cellulaire contrairement aux autres ligands du Gb3 comme la shiga toxine ou d'autres anticorps anti-Gb3 existants. Cet effet cytostatique observé est important à considérer car il peut diminuer la toxicité, observée avec la shiga toxine, sur les cellules saines exprimant le Gb3. Par conséquent, l'objectif de mes travaux est de mieux comprendre les différences mécanistiques observées entre la shiga toxine et le 3E2, qui induit l'inhibition de la prolifération cellulaire, en étudiant les différentes voies de signalisations cellulaires impliquées.

4- Etudes des propriétés de modulation de la signalisation cellulaire du 3E2

4-1- Matériels et méthodes

4-1-1- Lignées cellulaires

4-1-1-1- Les cellules endothéliales HMEC-1

La lignée HMEC-1 a été obtenue par l'équipe du professeur F. J. Caudal (*Center for Disease Control, Atlanta, GA, USA ; Ades et al., 1992*) par immortalisation de cellules endothéliales microvasculaires humaines par transfection d'un plasmide contenant la région codante de l'antigène T du virus simien 40 (SV40). Ces cellules sont cultivées et repiquées jusqu'à un maximum de 20 passages pour limiter le phénomène de dérive phénotypique. Elles sontensemencées à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées dans une atmosphère humide à 37°C et enrichie à 5% de CO₂ dans du milieu MCDB 131 (Invitrogen, Cergy Pontoise) comportant 15 % de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté, 10 ng/ml d'EGF (Peprotech, Neuilly sur Seine), 2 µg/ml d'hydrocortisone (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), 2 mM de L-glutamine (Gibco, Cergy Pontoise), 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg de streptomycine (Gibco).

4-1-1-2- La lignée tumorale Raji

Les cellules du lymphome humain Raji proviennent de l'ATCC (Rockville, USA). Ces cellules sontensemencées à raison de 10⁵ cellules/ml dans le milieu RPMI 1640 (Gibco), supplémenté de 10 % de SVF décomplémenté, 2 mM de L-Glutamine (Gibco), de 100 UI/ml de pénicilline et de 100 µg/ml de streptomycine (Sigma-Aldrich). Sa culture est réalisée à 37°C en atmosphère humide enrichie à 5% de CO₂.

4-1-1-3- L'hybridome 3E2

L'hybridome 3E2, obtenu au laboratoire et sécrétant l'anticorps monoclonal 3E2 spécifique du Gb3, estensemencé à 10⁵ cellules/ml dans le milieu RPMI 1640 (Gibco),

supplémenté de 10 % de SVF décomplémenté, 2 mM de L-Glutamine (Gibco), de 100 UI/ml de pénicilline et de 100 µg/ml de streptomycine (Sigma-Aldrich). Sa culture est réalisée à 37°C en atmosphère humide enrichie à 5 % de CO₂.

4-1-1-4- Test de viabilité cellulaire

Ce test est réalisé avec de l'éosine, un colorant vital. Un volume de suspension cellulaire est mélangé à un égal volume d'éosine à 0,15 %. Les cellules mortes, laissant pénétrer l'éosine, sont colorées en rouge. Les cellules vivantes sont incolores et comptées sur cellule de Malassez. Le pourcentage de viabilité est déterminé à partir de la formule suivante : pourcentage de viabilité = nombre de cellules vivantes / nombre total de cellules

4-1-2- Purification de l'anticorps monoclonal 3E2 par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine L

La purification est réalisée à l'aide d'une colonne de protéine L de 5 ml (GE Healthcare Amersham Biosciences, Uppsala, Suède) préalablement équilibrée par un tampon de *Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane-hydroxyl chlorydric acid* (Tris-HCl) 0,1 M (Sigma) à pH 7,8. Le surnageant de culture d'hybridome filtré est dilué au ½ avec le tampon d'équilibration et est chargé sur la colonne à un débit de 1 ml/min. La colonne est ensuite lavée avec 50 ml de tampon d'équilibration. L'anticorps 3E2 est élué de la colonne avec un tampon acide glycine/Na⁺ 0,1 M (VWR Prolabo, West Chester, Pennsylvanie, Etats-Unis) à pH 3 et collecté par fractions de 900 µL. Ces fractions sont immédiatement neutralisées par 100 µL de tampon 1 M Tris-HCl pH 9,0 préalablement déposés dans les tubes de collecte. L'absorbance de ces fractions est mesurée à une longueur d'onde $\lambda = 280$ nm et seules les fractions d'absorbance supérieures à 0,1 sont récupérées. L'anticorps monoclonal est ensuite dialysé contre une solution de PBS (Sigma) de pH 7,4. Après filtration stérilisante (0,2µm), la concentration finale d'anticorps est déterminée à partir de l'absorbance mesurée à $\lambda = 280$ nm (Loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon lC$ avec $\epsilon = 11,8 \text{ L. gm}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4-1-3- Analyse SDS-PAGE en conditions dénaturantes et réductrices de l'anticorps 3E2

L'échantillon d'anticorps monoclonal 3E2 est repris en tampon Tris-HCl 0,5M pH 6,8 contenant 10% de glycérol (VWR, Strasbourg), et 5% de 2-mercaptoéthanol (Promega, Madison, USA). Il est dénaturé par chauffage à 95°C pendant 2 minutes, puis analysé en électrophorèse *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Les échantillons sont déposés à raison de 5 µg par puits dans un gel de polyacrylamide de 1,5 mm d'épaisseur, avec une concentration en polyacrylamide de 12%. Après électrophorèse à 100 V pendant 2 heures à température ambiante, les gels sont fixés et colorés avec du bleu de Coomassie R250 (Quantum, Wixon, Michigan, USA). Les masses moléculaires sont calculées à partir de la migration du marqueur de masse moléculaire « precision plus all blue standard » (Biorad, Marne la Coquette).

4-1-4- Test immunoenzymatique ELISA indirect sur les cellules disséquées

4-1-4-1- Préparations des plaques ELISA

Les plaques de microtitration à fond plat (Nunc, Roskilde, Danemark) utilisées pour ce test sont préparées en répartissant 10^5 de cellules cibles par puits dans 50 µL de PBS (Sigma-Aldrich). Les plaques sont ensuite séchées dans une étuve sèche à 37°C jusqu'à évaporation complète du liquide. Ces plaques peuvent être conservées plusieurs semaines après dessiccation.

4-1-4-2- Réalisation de l'ELISA

L'anticorps 3E2 est déposé à une concentration initiale de 10 µg/ml dans 100 µL de PBS-BSA 0,1%. L'incubation se déroule pendant 2 heures à température ambiante. Après trois lavages au PBS, 100 µL d'anticorps polyclonal secondaire conjugué à la biotine (*Biot-goat anti mouse Fc*) (Beckmann Coulter, Fullerton, USA) dilué au $1/4000^{\text{ème}}$ dans du PBS-BSA 0,1%, dirigé contre l'anticorps 3E2, est déposé dans chaque puits. L'incubation dure une

heure et demie sous température ambiante. L'utilisation de cet anticorps nécessite ensuite l'ajout du complexe streptavidine-péroxydase (Jackson ImmunoResearch, West Baltimore Pike, USA), dilué au 1/4000^{ème} dans du PBS-BSA 0,1% pour une incubation supplémentaire d'une heure à température ambiante et sous agitation. Après trois lavages, le substrat de la peroxydase, le 2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt (ABTS) (Roche diagnostics, Myelan), est déposé à un volume de 100 µL dans chaque puits. Dès l'apparition d'une couleur verte, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à $\lambda = 405 \text{ nm}$.

4-1-5- Analyse SDS-PAGE en conditions dénaturantes et réductrices des protéines cytoplasmiques de HMEC-1

Les fractions protéiques récupérées, après lyse des cellules HMEC-1 congelées dans l'azote liquide puis à -80°C avec 75 µL de tampon de lyse, sont centrifugées pendant trente minutes à 12 000 rpm, à 4°C . Le culot cellulaire est éliminé puis la concentration protéique de chaque fraction est déterminée par la méthode colorimétrique de dosage protéique (*Bicinchoninic acid*, BCA). Soixante quinze µL de chaque fraction sont mélangés avec 15 µL d'un mélange constitué de β -mercaptoéthanol (60 µL) et de tampon de migration (440 µL). Les échantillons sont dénaturés par chauffage à 95°C pendant 10 minutes, puis analysés en électrophorèse SDS-PAGE. Les protéines sont déposées à raison de 20 µg par puits dans un gel de polyacrylamide de 1,5 mm d'épaisseur. Après électrophorèse, à 100V pendant 2 heures, les protéines sont transférées sur une membrane *Polyvinylidene fluoride* (PVDF) (VWR).

Espèce d'origine	Spécificité	Fournisseur	Dilution de travail	Format
Lapin	Phospho-p44 /42 MAPK (Erk ½ :Thr 202/204) (D13.14.E) XP™	Cell signaling	1 : 1000	IgG monoclonale
Lapin	Erk p42/44 137F5	Cell signaling	1 : 1000	IgG monoclonale
Lapin	Phospho-Akt S473 (D9E) XP™	Cell signaling	1 : 1000	IgG monoclonale
Lapin	Akt	Cell signaling/Ozyme 9272 L	1 : 1000	IgG monoclonale
Souris	Anti- βactine clone C4	Millipore	1 : 5000	IgG monoclonale
Chèvre	αMαR	Roche	1 : 1000	IgG polyclonale
Chèvre	Biotine conjugated Goat Antimouse	Beckman Coulter	1 : 4000	IgG polyclonale biotinée

Tableau 12. Anticorps utilisés dans l'immunoempreinte des protéines des cellules HMEC-1

4-1-6- Immunoempreinte

La membrane est récupérée et saturée pendant une heure dans une cuve avec du *Western Blocking Reagent* (WBR) dilué au 1/10^{ème} dans du *Tris Buffered Saline -Tween* (TBST) 0,1 %. L'anticorps primaire est incubé pendant 1h30 à température ambiante (Tableau 12). Après trois lavages avec du TBST 0,1 %, l'anticorps secondaire anti-HRP IgG αMαR, spécifique du fragment Fc de lapin ou de souris, est incubé en présence de la membrane pendant une heure à température ambiante. Après trois lavages, la solution de chimiluminescence (ECL) est déposée sur la membrane. La révélation est réalisée en utilisant l'Imager (Fusion Fx7,

Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée) et le logiciel Fusion. Les intensités de marquage sont évaluées à l'aide du logiciel image J (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA), et exprimées en niveau d'intensité relative après normalisation par rapport la β -actine, utilisée comme protéine de référence.

4-2- Résultats

4-2-1- Production du surnageant de culture de l'hybridome 3E2

L'hybridome 3E2 a été sélectionné et utilisé pour produire l'anticorps 3E2 monoclonal de souris spécifique du Gb3 (IgM, kappa). Il a été obtenu au laboratoire par une hybridation de cellules de myélomes sp20 avec des splénocytes, de souris Balb/c immunisés avec des cellules endothéliales, sélectionnés dans du milieu HAT. Les cellules sont ensemencées dans du RPMI. Les résultats présentés dans la Figure 15, sont exprimés en nombre de cellules/ml en fonction du temps. Les cellules sont dans une phase de croissance exponentielle les quatre premiers jours. A partir de J5, les cellules sont au maximum de densité et à partir de J6, Les cellules commencent à mourir en raison de l'épuisement du milieu de culture. Trois litres de surnageant de l'hybridome 3E2 ont été produits en vue de purifier l'anticorps monoclonal 3E2 anti-Gb3. Au vu des résultats présentés en Figure 15, le surnageant de culture est prélevé à J5.

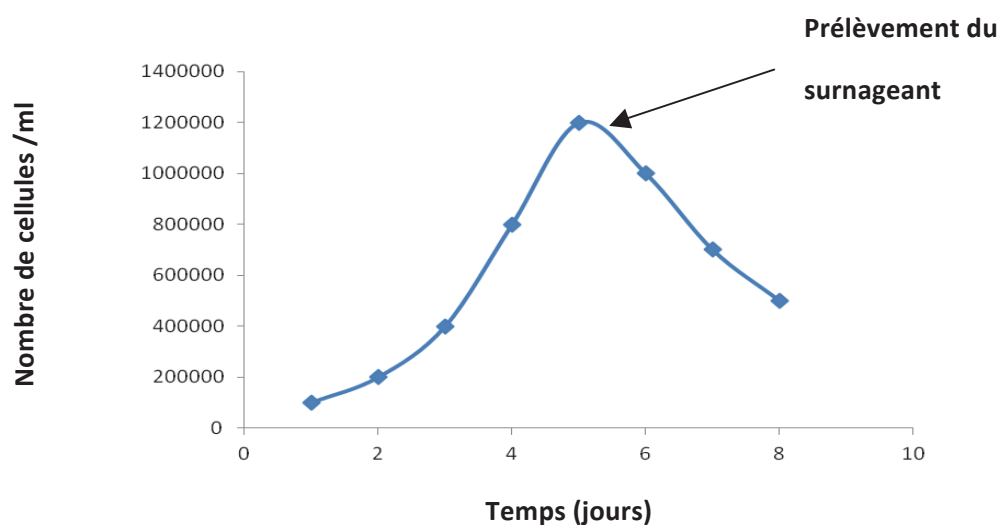


Figure 15. Courbe de croissance de la lignée cellulaire 3E2 exprimée en nombre de cellules par ml en fonction du temps.

4-2-2- Purification de l'anticorps monoclonal 3E2 par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine L

L'anticorps monoclonal 3E2 a été purifié à partir des 3 L de surnageant par la technique de chromatographie d'affinité sur colonne de protéine L. Le profil d'élution de l'anticorps 3E2 retenu sur la protéine L est représenté Figure 16. Les fractions 7 à 21, qui correspondent aux fractions avec une absorbance à 280 nm supérieure à 0,1 sont dialysés contre du PBS. La concentration protéique déterminée par la lecture de l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda=280$ nm au nanodrop ND-1000 (Labtech, Ringmer, Royaume-Uni) nous permet de calculer la quantité d'anticorps récupérés (soit 3,52 mg au total).

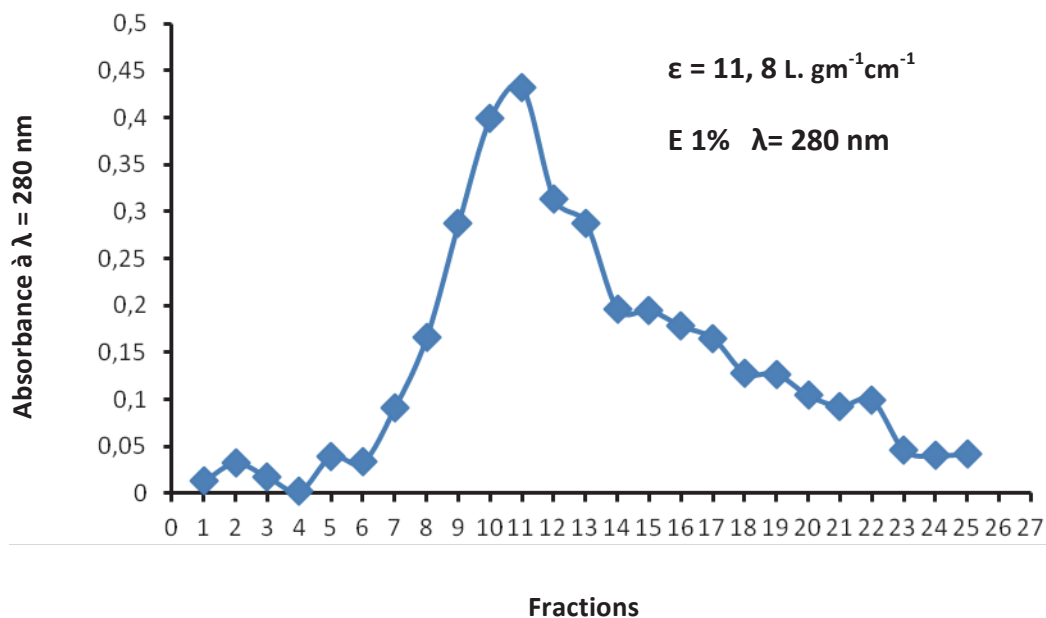


Figure 16. Profil d'élution de l'anticorps 3E2 par chromatographie d'affinité sur protéine L par mesure de l'absorbance à $\lambda= 280$ nm des différentes fractions collectées.

4-2-3- Analyse SDS-PAGE de l'anticorps monoclonal 3E2 purifié

L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu réducteur de l'échantillon purifié permet d'identifier les différentes chaînes et pièce de l'anticorps monoclonal 3E2 purifié. Les immunoglobulines de classe IgM sont définies en électrophorèse SDS-PAGE par trois bandes de migrations. Une bande supérieure de masse moléculaire de 75

kDa correspondant aux chaînes lourdes, une bande de 50 kDa correspondant à la pièce J et une bande inférieure de 25 kDa qui représente les chaînes légères (Figure 17). L'absence de bandes supplémentaires permet de certifier la pureté du lot d'anticorps produit.

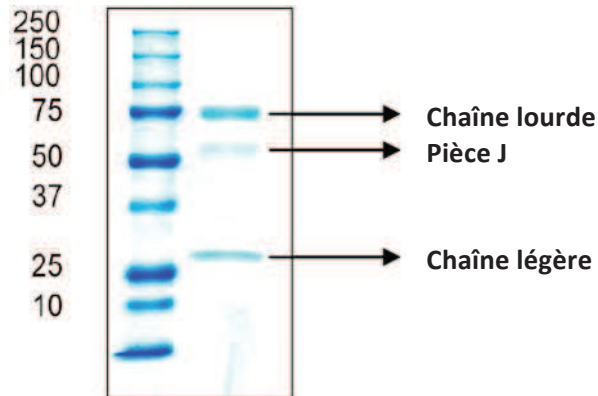


Figure 17. Analyse électrophorétique SDS-PAGE de l'anticorps monoclonal 3E2 purifié en conditions dénaturantes et réductrices avec un gel de polyacrylamide 12%.

4-2-4- Activité de l'anticorps monoclonal 3E2 purifié par méthode ELISA

L'activité de l'anticorps monoclonal 3E2 purifié a été analysée sur des cellules desséchées exprimant le Gb3. Cet anticorps se fixe sur les cellules desséchées Raji exprimant le Gb3 de façon dose-dépendante (Figure 18).

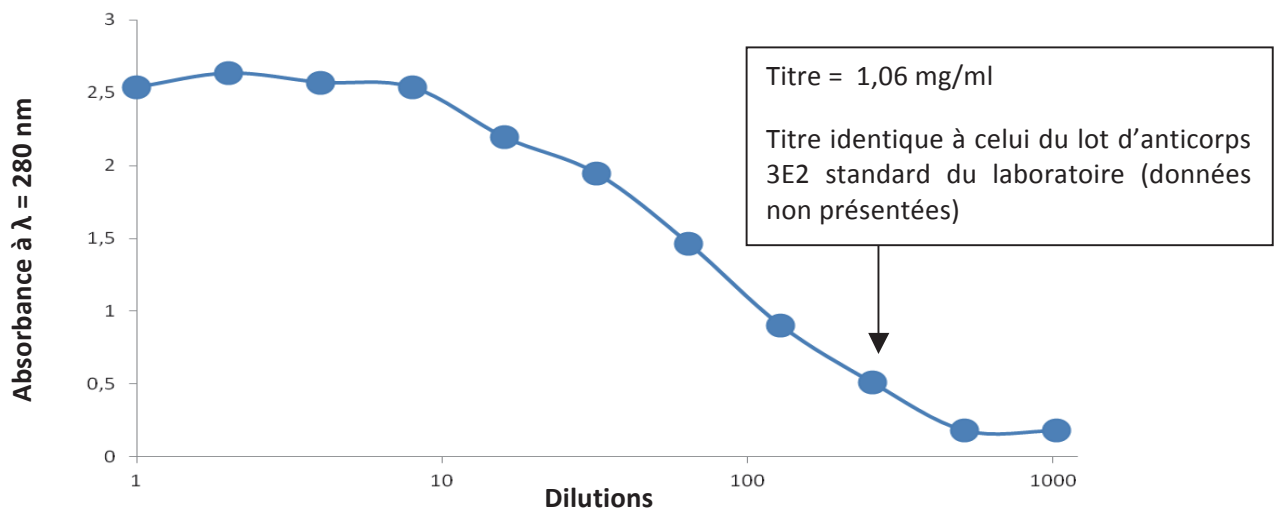


Figure 18. Etude de la spécificité de l'anticorps monoclonal 3E2 révélé par du GAM-HRP par test immunoenzymatique ELISA sur cellules desséchées Raji.

4-2-5- Voies de signalisations impliquées dans l'effet cytostatique du 3E2

4-2-5-1- *Voie de signalisation Erk*

Les protéines Erk 1 et 2 sont deux isoformes respectivement de poids moléculaire de 44 et 42 kDa. Une cinétique sur des temps courts, allant de 15 minutes à 2 heures, est réalisée sur cellules HMEC-1. Lorsque les cellules sont à 70 % de confluence, alors l'anticorps 3E2, ou le PBS pour le contrôle négatif, est ajouté à une concentration de 40 µg/ml. L'analyse des protéines Erk et p-Erk, par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices par immunoempreinte, montre une diminution de la phosphorylation pour les temps 15 et 30 minutes (Figure 19 et 20). Cette diminution est suivie d'une augmentation de la phosphorylation de Erk au temps 1 heure, ce qui suggère la mise en place par la cellule d'un mécanisme d'adaptation à cette diminution précoce de la phosphorylation de Erk (Figure 19 et 20), puis d'un retour à l'état basal à 2 heures (Figure 20).

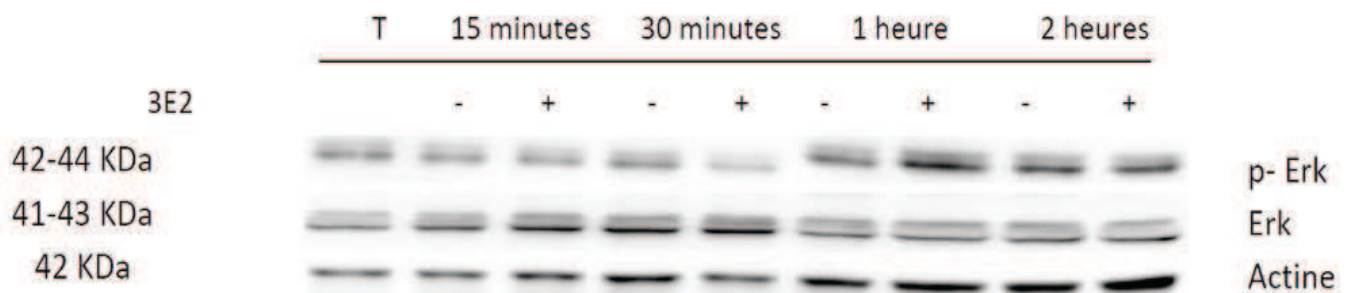


Figure 19. Niveau d'expression des protéines p-Erk et Erk totale en fonction du temps d'incubation des cellules HMEC-1 en présence de l'anticorps 3E2 à une concentration de 40 µg/ml.

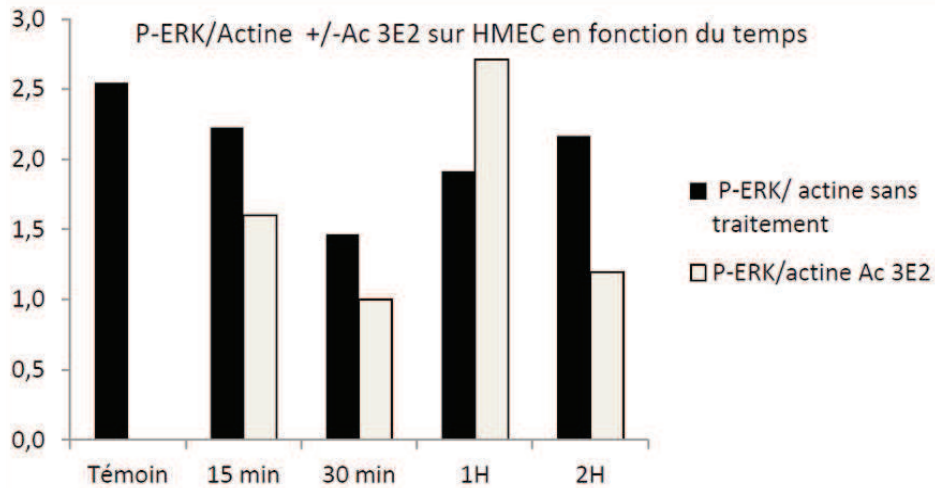


Figure 20. Evaluation des rapports de la quantité protéique de phospho-Erk/actine en fonction des temps d'incubation des cellules HMEC-1 en présence de l'anticorps 3E2 à une concentration de 40 µg/ml.

4-5-2- 2- Voie de signalisation Akt ou protéine kinase B

La protéine kinase B ou Akt a un poids moléculaire 60 kDa. Les conditions expérimentales pour analyser l'action du 3E2 sur la voie de signalisation Akt sont les mêmes que pour la voie de signalisation Erk. Les résultats présentés dans la Figure 21 et 22 montre un phénomène similaire à celui observé sur la voie de signalisation Erk mais plus tardif. En effet, une diminution de la phosphorylation de Akt est observée à 30 min suivie d'une augmentation à 1 heure et un retour à un niveau basal à 2 heures (Figure 21 et 22).

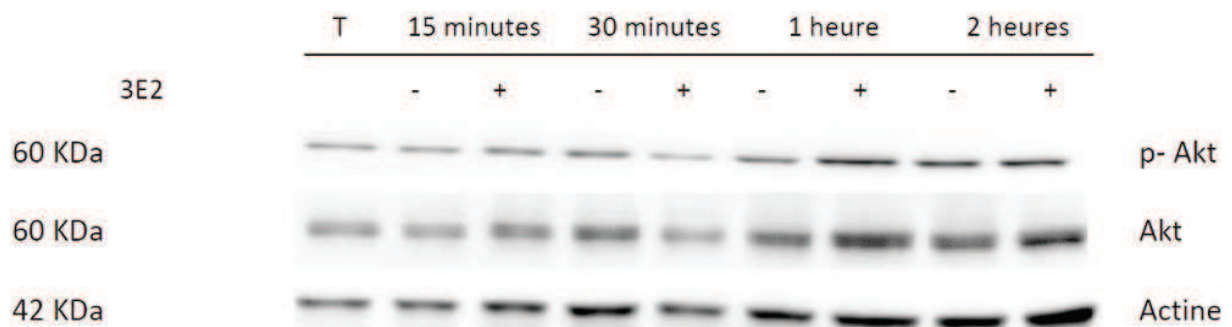


Figure 21. Niveau d'expression des protéines p-Akt et Akt totale en fonction du temps d'incubation des cellules HMEC-1 en présence de l'anticorps 3E2 à une concentration de 40 µg/ml.

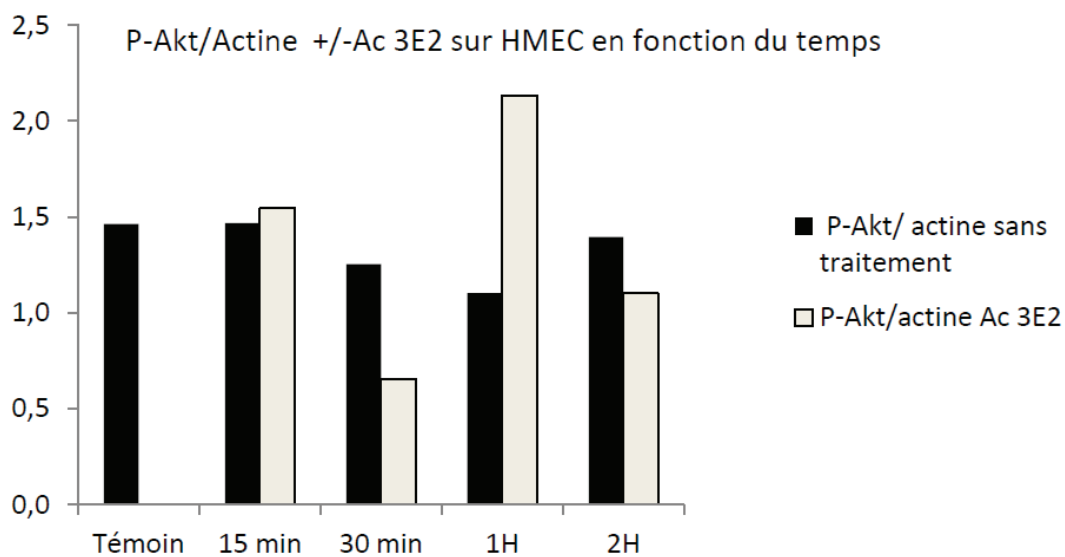


Figure 22. Evaluation des rapports de quantité protéique de p-Akt/actine en fonction des temps d'incubation des cellules HMEC-1 en présence de l'anticorps 3E2 à une concentration de 40 µg/ml

4-3- Discussion

En complément à la chimiothérapie et à la chirurgie, l'immunothérapie et les thérapies anti-angiogéniques constituent une nouvelle approche dans le traitement des cancers. Afin de préparer des anticorps spécifiques des cellules endothéliales intra-tumorales, des souris Balb/c ont été immunisées avec des cellules HMVEC-L préparées selon un modèle de co-culture en présence de carcinome colique humaine T 84 mimant le micro-environnement tumoral (Gaugler *et al.*, 2007). Après hybridation somatique, plusieurs hybridomes spécifiques du globotriaosyl Gb3, un glycolipide neutre faiblement immunogène, ont été obtenus. Cette découverte nous a amenés à nous interroger sur le rôle du Gb3 dans l'angiogenèse tumorale en utilisant l'hybridome 3E2 spécifique du Gb3. Cet hybridome a été sélectionné parmi six autres hybridomes obtenus au laboratoire car il présentait la meilleure affinité.

L'apport des anticorps monoclonaux dans l'étude des glycolipides a été d'un grand intérêt en révélant à la fois une plus grande diversité structurale des glycolipides et une restriction spatio-temporelle de leur distribution tissulaire. De plus, ils ont permis

l'identification de certains glycolipides comme des antigènes de tumeurs et ont révélés l'implication des glycolipides dans la biologie des cellules comme l'apoptose. Les anticorps sont donc des outils indispensables pour comprendre l'importance fonctionnelle des glycolipides. Pour cela, leur purification est essentielle et bien qu'étant très hétérogène, ils ont néanmoins en commun un certain nombre de caractéristiques structurales et physico-chimiques et de propriétés fonctionnelles qui permettent leur purification et leur individualisation. Ainsi, de nombreuses méthodes ont été utilisées pour purifier des anticorps spécifiques d'un antigène ou bien pour séparer des immunoglobulines à partir d'un mélange protéique complexe : précipitation, gel filtration, échangeuses d'ions. Toutefois, la méthode la plus rapide et la moins onéreuse consiste à purifier les anticorps par chromatographie d'affinité avec la protéine A ou la protéine G. Ce sont des protéines de source bactérienne qui ont la capacité de se fixer sur la région Fc des anticorps. C'est une méthode de purification rapide, mais elle n'est pas efficace pour toutes les sous-classes d'anticorps et en particulier elle n'est pas applicable aux anticorps de classe M. En effet, la protéine A et protéine G se lient très mal ou pas du tout, en partie parce que les sites de liaison sur les régions Fc de l'IgM sont encombrés stériquement par sa structure pentamérique. Aussi, beaucoup d'anticorps de classe IgM ne sont pas valorisés du fait de leur difficulté de purification. Les techniques conventionnelles sont souvent fastidieuses en raison d'étapes multiples à optimiser (précipitation, gel filtration, échangeuses d'ions) et nous nous sommes heurtés comme d'autres laboratoires à la difficulté de disposer d'anticorps purifiés et stables. Nous avons abandonné la chromatographie d'affinité couplée au MBP (*Manose Binding Protein*) (Nethery *et al.*, 1990) pour la purification du 3E2 en raison de son faible rendement. Une protéine récemment découverte, la protéine L (GE Healthcare Amersham Biosciences), se lie à certaines chaînes k des anticorps quelque soit leur classe. Aussi, pour réduire les problèmes corollaires, le rendement faible (pertes à chaque étape), perte de spécificité ou stabilité, coûts importants, nous avons utilisé dans le cas du 3E2 la protéine L. L'analyse SDS PAGE de l'AcM 3E2 ainsi purifié ainsi que l'analyse de sa spécificité par test immuno-enzymatique ELISA, nous indique qu'un seul passage sur la colonne de protéine L permet d'obtenir l'anticorps fonctionnel avec une pureté $\geq 95\%$.

La disponibilité de l'AcM 3E2 à l'état purifié permet à présent de mettre en évidence les propriétés effectrices de cet anticorps. De façon surprenante, des études complémentaires menées par A. Desselle (Desselle *et al.*, 2012) ont démontré que l'AcM 3E2

anti-Gb3 était capable d'inhiber la viabilité des cellules endothéliales en prolifération indépendamment du recrutement d'effecteur du système immunitaire comme le complément et de l'apoptose. En dehors de son rôle de récepteur cellulaire aux toxines bactériennes de la famille des vérotoxines, les fonctions biologiques du Gb3 demeurent encore hypothétiques. L'implication des glycolipides dans la prolifération cellulaire est suggérée par leur présence dans les radeaux lipidiques où ils peuvent s'associer à des molécules impliquées dans la signalisation cellulaire. Par exemple, le marqueur glycolipidique tumoral GD2 est associé aux intégrines à la surface des cellules de carcinome pulmonaire à petites cellules (Yoshida *et al.*, 2001). La fixation d'un anticorps anti-GD2 à son antigène induit la dissociation du complexe GD2-intégrine et la déphosphorylation de la Focal Adhesion Kinase suivi de la mort de la cellule tumorale par anoïkis (Aixinjueluo *et al.*, 2005).

Pour pouvoir comprendre les propriétés cytotoxiques des anticorps spécifiques de l'épitope Gb3 et afin d'utiliser ces anticorps à des fins thérapeutiques, nous nous sommes engagés à caractériser les mécanismes de signalisation qui régulent l'inhibition de viabilité des cellules endothéliales. Nous rapportons ici que la fixation de l'AcM 3E2 au Gb3 à la surface des cellules entraîne une déphosphorylation transitoire des protéines intracellulaires Erk et Akt deux protéines à activité kinase reconnues pour leur implication dans la prolifération cellulaire. L'action sur les protéines du cycle cellulaire, possédant une cinétique plus tardive, doit être maintenant démontrée. Une première série d'expériences sur les protéines Forkhead Box O (FOXO), cibles d'Akt et Erk et de cinétiques plus tardives, ne nous a pas permis de mettre en évidence une modification particulière sur ces protéines intracellulaires (données non présentées). De plus, deux autres expériences de cinétique de 24 heures, ont été réalisées ciblant les protéines p21 et p27 au cours desquelles aucune modification n'a été observée (données non présentées). Il serait intéressant de rechercher l'action potentielle de l'AcM 3E2 anti-Gb3 sur d'autres protéines inhibant la formation du complexe cycline/cdk comme p57 ou entrant en compétition avec les cyclines pour la liaison au cdk comme p16 ou p18. Nous envisageons également de caractériser une éventuelle protéine membranaire associée au Gb3, par immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps 3E2, qui pourrait être impliquée dans la signalisation cellulaire. Quoiqu'il en soit, la caractérisation des mécanismes conduisant à l'inhibition de la viabilité des cellules endothéliales induites par l'anticorps 3E2 spécifique du Gb3 permettra d'identifier de

nouvelle(s) cible(s) moléculaire(s) impliquée(s) dans la prolifération des cellules endothéliales intra-tumorales. Celle-ci permettra de proposer de nouvelles thérapies destinées aux patients ayant développé une résistance adaptative aux traitements actuels reposant sur l'utilisation du bevacizumab.

L'expression du Gb3 sur les cellules endothéliales est augmentée lorsque ces cellules sont en phase de prolifération ou sous l'influence d'un facteur pro-angiogénique comme le VEGF. La néovascularisation chez l'adulte étant observé essentiellement dans des processus de cancérogénèse, le Gb3 devient un marqueur de l'angiogénèse tumorale intéressant.

Bibliographie

Ackermann S., Goeser F., Schulte J.H., Schramm A., Ehemann V., Hero B., Eggert A., Berthold F., and Fischer M. (2011). "Polo-like kinase 1 is a therapeutic target in high-risk neuroblastoma." *Clin Cancer Res.*; 17(4):731-41.

Aixinjueluo, W., Furukawa K., Zhang Q., Hamamura K., Tokuda N., Yoshida S., Ueda R. et al. (2005). "Mechanisms for the apoptosis of small cell lung cancer cells induced by anti-GD2 monoclonal antibodies: roles of anoikis." *J Biol Chem*, 280 : 29828-36.

Alexander T., Nolte C., Krumlauf R. (2009). "Hox genes and segmentation of the hindbrain and axial skeleton." *Annu Rev Cell Dev Biol*; 25:431–56.

Alvarado C.S., Kretschmar C., Toledano S., Cantor A., Strother D., et al. (1997). "Chemotherapy for patients with recurrent or refractory neuroblastoma: a POG Phase II study." *J Pediatr Hematol Oncol*; 19:62-7.

Alvarez-Rueda N., Desselle A., Cochonneau D., Chaumette T., Clemenceau B., Leprieur S., Bougras G., Supiot S., Mussini J.M., Barbet J., Saba J., Paris F., Aubry J., Birklé S. (2011). "A monoclonal antibody to O-acetyl-GD2 ganglioside and not to GD2 shows potent anti-tumor activity without peripheral nervous system cross-reactivity." *PLoS One* 2011; 6:e25220.

Ambros I.M., Zellner A., Roald B., Amann G., Ladenstein R., Printz D., Gadner H., Ambros P.F. (1996). "Role of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma." *N Engl J Med*; 334:1505-11.

Ambros P.F., Ambros I.M., Brodeur G.M., Haber M., Khan J., Nakagawara A., et al. (2009). "International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) biology committee." *Br J Cancer*; 100:1471-82.

Ametist, <http://www.ametist.org> (Consulté le 31 octobre 2012)

Ametist, http://www.ametist.org/association_ametist.php (Consulté le 31 octobre 2012)

Ametist, http://www.ametist.org/association_ametist_personalitees.php (Consulté le 31 octobre 2012)

Arab S. et Lingwood C. (1998). "Intracellular targeting of the endoplasmic reticulum/nuclear envelope by retrograde transport may determine cell hypersensitivity to Verotoxin: sodium butyrate or selection of drug resistance may induce nuclear toxin targeting via globotriosyl ceramide fatty acid isoform traffic." *J Cell Physiol* 177:646–660.

Arab S., Russel E., Chapman W., Rosen B., et Lingwood, C. (1997). "Expression of the Verotoxin receptor glycolipid, globotriaosylceramide, in Ovarian Hyperplasias." *Oncol Res*, 9:553–563.

Arab S., Rutka J. et Lingwood, C. "Verotoxin induces apoptosis and the complete, rapid, long term elimination of human astrocytoma xenografts in nude mice." Oncol Res

Artavanis-Tsakonas S., Rand M.D., et Lake R.J. "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." Science; 284:770–6.

Bach A., Lallemand Y., Nicola M.A., Ramos C., Mathis L., Maufras M., and Robert B. (2003). "Msx1 is required for dorsal diencephalon patterning." Development; 130:4025–4036

Bäckman U., Svensson A., Christofferson R. (2002). "Importance of vascular endothelial growth factor A in the progression of experimental neuroblastoma." Angiogenesis.; 5:267-74.

Bagatell R., Beck-Popovic M., London W.B., Zhang Y., Pearson A.D., Matthay K.K., et al. (2009). "International Neuroblastoma Risk Group. Significance of MYCN amplification in international neuroblastoma staging system stage 1 and 2 neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group database." J Clin Oncol; 27:365-70.

Bagatell R., Rumcheva P., London W.B., Cohn S.L., Look A.T., Brodeur G.M., et al. (2005). "Outcomes of children with intermediate-risk neuroblastoma after treatment stratified by MYCN status and tumor cell ploidy." J Clin Oncol; 23:8819-27

Behnam-Motlagh P., Tyler A., Grankvist K., Johansson A. (2010). "Verotoxin-1 treatment or manipulation of its receptor globotriaosylceramide (gb3) for reversal of multidrug resistance to cancer chemotherapy." Toxins;2(10):2467-77.

Berdasco M. (2009). "Epigenetic inactivation of the Sotos overgrowth syndrome gene histone methyltransferase NSD1 in human neuroblastoma and glioma." Proc Natl Acad Sci USA; 106 : 21830–21835.

Berger A., Tuechler C., Almer D., Kogner P., Ratschek M., Kerbl R., et al. (2002). " Elevated expression of galanin receptors in childhood neuroblastic tumors." Neuroendocrinology; 75:130–8.

Berger S.L., Kouzarides T., Shiekhattar R. and Shilatifard A. (2009). "An operational definition of epigenetics." Genes Dev; 23:781–783.

Berry-Kravis E.M., Zhou L., Rand C.M., and Weese-Mayer D.E. (2006). "Congenital central hypoventilation syndrome: PHOX2B mutations and phenotype." Am J Respir Crit Care Med; 174 : 1139-44

Berthold F, Engelhardt-Fahrner U, Schneider A, Schumacher R, and Zieschang J. (1991). "Age dependence and prognostic impact of neuron specific enolase (NSE) in children with neuroblastoma." In Vivo; 5 : 245-7.

- Bordow S.B., Norris M.D., Haber P.S., Marshall G.M., and Haber M. (1998). "Prognostic significance of MYCN oncogene expression in childhood neuroblastoma." J Clin Oncol; 16 : 3286–94.
- Bouché N., Scharlat A., Snedden W., Bouchez D., and Fromm H. (2002). "A novel family of calmodulin-binding transcription activators in multicellular organisms." J Biol Chem; 277 : 21851–61
- Boutros J., Bond M., Beaudry P., Blair G.K., and Skarsgard E.D. (2008). "Case selection in minimally invasive surgical treatment of neuroblastoma." Pediatr Surg Int; 24:1177-80.
- Bowman L.C., Castleberry R.P., Cantor A., Joshi V., Cohn S.L., Smith E.I., et al. (1997) Genetic staging of unresectable or metastatic neuroblastoma in infants: a Pediatric Oncology Group Study. J Natl Cancer Inst; 89:373-80.
- Bown N., Cotterill S., Lastowska M., O'Neill S., Pearson A.D., Plantaz D., et al. (1999). "Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma." N Engl J Med; 340:1954–61.
- Boztug K., Kiely E., Roebuck D.J., Gaze M., Begent J., Brock P., et al. (2006). "Successful treatment of MYCN amplified, progressive stage 4S neuroblastoma in a neonate with hepatic artery embolization in addition to multimodality treatment." Pediatr Blood Cancer; 46:253-7.
- Brem S. (1999). "Angiogenesis and cancer control: from concept to therapeutic trial." Cancer Contr; 6:436–58.
- Breit S., Ashman K., Wilting J., Rössler J., Hatzi E., Fotsis T., Schweigerer L. (2000). "The N-myc oncogene in human neuroblastoma cells: down-regulation of an angiogenesis inhibitor identified as activin A." Cancer Res; 60 : 4596-601.
- Brisse H.J., Beth McCarville M., Granata C., Krug K.B., Wootton-Gorges S.L., Kanegawa K., Giammarile F., et al (2011). Guidelines for Imaging and Staging of Neuroblastic Tumors: Consensus Report from the International Neuroblastoma Risk Group Project. Radiobiology, 261 : 243-257
- Brodeur G.M. et Castleberry R.P. (1997) in Neuroblastoma.: Pizzo P.A, Poplack D.G, editors. Principles and practice of pediatrics. Philadelphia, PA: Lippincot-Raven, p. 761-97
- Brodeur G.M., Minturn J.E., Ho R., Simpson A.M., Iyer R., Varela C.R., Light J.E., Kolla V., Evans A.E. (2009). "Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas." Clin Cancer Res; 15:3244-50.
- Brodeur G.M., Pritchard J., Berthold F., Carlsen N.L., Castel V., Castelberry R.P., et al. (1993) "Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment." J Clin Oncol; 11:1466-77.

Brodeur G.M., Seeger R.C., Barrett A., Berthold F., Castleberry R.P., D'Angio G., et al. (1988). "International criteria for diagnosis, staging and response to treatment in patients with neuroblastoma." J Clin Oncol; 6:1874-81.

Brodeur G.M., Seeger R.C., Schwab M., Varmus H.E., Bishop J.M. (1985). "Amplification of N-myc sequences in primary human neuroblastomas: correlation with advanced disease stage." Prog Clin Biol Res; 175: 105–13.

Çağan E., Sayın R., Doğan M., Peker E., Çağan H.H., Çaksen H., (2010). Bilateral brachial plexus palsy and right Horner's syndrome due to congenital cervicothoracic syringomyelia. Brain Dev; 32:595-7

Cahan L.D., Irie R.F., Singh R., Cassidenti A., and Paulson J.C. (1982). "Identification of a human neuroectodermal tumor antigen (OFA-I-2) as ganglioside GD2." Proc Natl Acad Sci U S A; 79:7629–7633

Cañete A., Navarro S., Bermúdez J., Pellín A., Castel V., and Llombart-Bosch A. (2000). "Angiogenesis in neuroblastoma: relationship to survival and other prognostic factors in a cohort of neuroblastoma patients." J Clin Oncol; 18:27-34.

Carlsen N.L. (1994). "Neuroblastomas in Denmark 1943–80. Epidemiological and clinical studies." Acta Paediatrica Supplement; 403:1–27.

Carmeliet P. et Jain R.K. (2011). "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis." Nature; 473:298–307.

Carpenter E.L. et al. (2011). "Antibody targeting of anaplastic lymphoma kinase induces cytotoxicity, of human neuroblastoma." Oncogene; 10.1038/onc.2011.647

Carpenter E.L. et al. (2012). "Antibody targeting of anaplastic lymphoma kinase induces cytotoxicity of human neuroblastoma." Oncogene ; doi: 10.1038/onc.2011.647.

Carpenter E.L. et Mossé Y.P. (2012). "Targeting ALK in neuroblastoma-preclinical and clinical advancements." Nat. Rev. Clin. Oncol; 9:391-9.

Castle V.P., Heidelberger K.P., Bromberg J., Ou X., Dole M., and Nunez G. (1993). "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.

Castle V.P., Ou X., O'Shea S., and Dixit V.M. (1992). "Induction of thrombospondin 1 by retinoic acid is important during differentiation of neuroblastoma cells." J Clin Invest; 90:1857–63.

Castleberry R.P. (1997). "Biology and treatment of neuroblastoma." Pediatr Clin North Am; 44:919–937.

Cecchetto G., Mosseri V., De Bernardi B., Helardot P., Monclair T., Costa E., et al. (2005). "Surgical risk factors in primary surgery for localized neuroblastoma: the LNESG1 study of the European International Society of Pediatric Oncology Neuroblastoma Group." J Clin Oncol; 23:8483-9.

Chang T-C., Wentzel E.A., Kent O.A., Ramachandran K., Mullendore M., Lee K.H., Feldmann G., Yamakuchi M., Ferlito M., Lowenstein C.J. et al. (2007). "Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis." Molecular Cell; 26 745–752.

Chen Y. et Stallings R.L. (2007). "Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis." Cancer Res; 67: 976–983

Chen Y.Y., Takita J., Choi Y.L., Kato M., Ohira M., Sanada M. et al. (2008). "Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma." Nature; 455:971-4.

Cheung N.K., Lazarus H., Miraldi F.D., Abramowsky C.R., Kallick S., et al. (1987). "Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma." J Clin Oncol; 5: 1430–1440.

Chu C.M., Rasalkar D.D., Hu Y.J., Cheng F.W., Li C.K., Chu W.C. (2011). "Clinical presentations and imaging findings of neuroblastoma beyond abdominal mass and a review of imaging algorithm." Br J Radiol 84:81-91.

ClinicalTrials,

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00499616?term=Neuroblastoma&phase=2&rank=3>
(Consulté le 20 août 2012)

Cohen P.S., Cooper M.J., Helman L.J., Thiele C.J., Seeger R.C. et Israel M.A. (1990). "Neuropeptide Y expression in the developing adrenal gland and in childhood neuroblastoma tumors." Cancer; 50 6055–6061.

Cohn S.L., London W.B., Huang D., Katzenstein H.M., Salwen H.R., Reinhart T., et al. (2000). "MYCN expression is not prognostic of adverse outcome in advanced-stage neuroblastoma with nonamplified MYCN." J Clin Oncol; 18:3604–13.

Cohn S.L., Pearson A.D., London W.B., Monclair T., Ambros P.F., Brodeur G.M., et al. (2009). "The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report." J Clin Oncol; 27:289-97.

Combaret V., Gross N., Lasset C., Frappaz D., Peruisseau G., Philip T., et al. (1996). "Clinical relevance of CD44 cell-surface expression and N-myc gene amplification in a multicentric analysis of 121 pediatric neuroblastomas." J Clin Oncol; 14:25–34.

- Crawford S.E., Stellmach V., Ranalli M., Huang X., Huang L., Volpert O., De Vries G.H., Abramson L.P., Bouck N. (2001). "Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity." J Cell Sci; 114:4421-8.
- D'Amato R.J., Loughnan M.S., Flynn E., Folkman J. (1994). "Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis." Proc Natl Acad Sci USA; 91:4082-5.
- Davidoff A.M. (2010). Pediatric Oncology, Semin Pediatr Surg; 19: 225-233.
- Davis G.E., Bayless K.J., Davis M.J. et Meininger, G.A. (2000). "Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules." Am. J. Pathol; 156:1489-1498.
- De Bernardi B., Balwierz W., Bejent J., Cohn S.L., Garrè M.L., Iehara T., et al. (2005). "Epidural compression in neuroblastoma: diagnostic and therapeutic aspects." Cancer Lett; 228:283-99.
- De Roos A.J., Olshan A.F., Teschke K., Poole C., Savitz D.A., Blatt J., et al. (2001). "Parental occupational exposures to chemicals and incidence of neuroblastoma in offspring." Am J Epidemiol; 154:106-14.
- Derek M.M., Patrick G.B., Sudipto D., Karen M.W., Kenneth B., Raymond L.S. (2011). "Co-Localization of the Oncogenic Transcription Factor MYCN and the DNA Methyl Binding Protein MeCP2 at Genomic Sites in Neuroblastoma." PLoS ONE 6: e21436.
- Deryugina E.I. et Quigley J.P. (2010). "Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions." Biochim. Biophys. Acta 1803, 103-120.
- Desselle A., Chaumette T., Gaugler M.H., Cochonneau D., Fleurence J., Dubois N., et al. (2012). Anti-Gb3 monoclonal antibody inhibits angiogenesis and tumor development. PLoS ONE 7: e45423
- Desgrosellier J.S. et Cheresch D.A. (2010). "Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities." Nat Rev Cancer; 10:9-22.
- Dickson P.V., Hamner J.B., Sims T.L., et al. (2007). "Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy." Clin Cancer Res; 13:3942-50.
- Dijkmans T.F., van Hooijdonk L.W.A., Fitzsimons C.P. et Vreugdenhil E. (2010). "The doublecortin gene family and disorders of neuronal structure." Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry, 10:32-46.

Distler, U., J. Souady, Hülsewig M, Drmić-Hofman I, Haier J, Friedrich AW, Karch H et al. (2009). "Shiga toxin receptor Gb3Cer/CD77: tumor-association and promising therapeutic target in pancreas and colon cancer." PLoS One, 4 : e6813.

Dötsch J., Christiansen H., Hänze J., Lampert F. et Rascher W. (1998). "Plasma neuropeptide Y of children with neuroblastoma in relation to stage, age and prognosis, and tissue neuropeptide Y." Regulatory Peptides; 75–76: 185–190.

Durrant L.G., Noble P., et Spendlove I. (2012). "Immunology in the clinic review series; focus on cancer: glycolipids as targets for tumour immunotherapy." Clin Exp Immunol; 167:206-15.

Eggert A., Ikegaki N., Kwiatkowski J., Zhao H., Brodeur G.M., Himelstein B.P. (2000). "High-level expression of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas." Clin Cancer Res; 6:1900-8.

Eggert A., Grotzer M.A., Ikegaki N., Liu X.G., Evans A.E., Brodeur G.M. (2002). "Expression of the neurotrophin receptor TrkA down-regulates expression and function of angiogenic stimulators in SH-SY5Y neuroblastoma cells." Cancer Res.; 62:1802-8.

Eisenhauer, P.B. et al. (2001). "Tumour necrosis factor alpha increases human cerebral endothelial cell Gb3 and sensitivity to Shiga toxin." Infect Immun 69, 1889–1894

Emanuele S., Lauricella M., et Tesoriere G. (2008). "Histone deacetylase inhibitors: apoptotic effects and clinical implications (Review)." Int J Oncol; 33:637–46.

Enfance et cancer, <http://www.enfance-et-cancer.org/lassociation/presentation> (Consulté le 31 octobre 2012)

Enfant et santé, http://www.enfants-sante.asso.fr/corporate/page/associations_en_region (Consulté le 31 octobre 2012)

Enfant et santé, <http://www.enfants-sante.asso.fr/corporate/page/history> (Consulté le 31 octobre 2012)

Erdreich-Epstein A., Shimada H., Groshen S., Liu M., Metelitsa L.S., Kim K.S., Stins M.F., Seeger R.C., Durden D.L. (2000). "Integrins alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 are expressed by endothelium of high-risk neuroblastoma and their inhibition is associated with increased endogenous ceramide." Cancer Res.; 60:712-21.

Esiashvili N., Goodman M., Ward K., Marcus RB. Jr, Johnstone P.A. "Neuroblastoma in adults: incidence and survival analysis based on SEER data." Pediatr Blood Cancer; 49:41-6.

Esteller M., (2008). "Epigenetics in cancer." N Engl J Med.; 358:1148–1159

Falguieres T., Maak M., von Weyhern C, Sarr M, Sastre X, Poupon MF, Robine S, et al. (2008). "Human colorectal tumors and metastases express Gb3 and can be targeted by an intestinal pathogen-based delivery tool." Mol Cancer Ther, 7: 2498-508.

- Feinberg A.P., (2005). "Cancer epigenetics is no Mickey Mouse." Cancer Cell, 8: 267–268
- Fish J.E. et Srivastava D. (2009). "MicroRNAs: opening a new vein in angiogenesis research." Sci Signal; 2:pe1.
- Fontana L., Fiori M.E., Albini S., Cifaldi L., Giovinnazzi S., Forloni M., Boldrini R., Donfrancesco A., Federici V., Giacomini P. et al. (2008). "Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM." PLoS ONE 3:e2236.
- Fotsis T., Breit S., Lutz W., Rössler J., Hatzi E., Schwab M., Schweigerer L. (1999). "Down-regulation of endothelial cell growth inhibitors by enhanced MYCN oncogene expression in human neuroblastoma cells." Eur J Biochem; 263:757-64.
- Franco O.E., Shaw A.K., Strand, D.W. et Hayward, S.W. (2010). "Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis." Semin Cell Dev Biol; 21:33–39.
- Frost J.D., Hank J.A., Reaman G.H., Friedrich S., Seeger R.C., Gan J., et al. (1997). "A phase I/IB trial of murine monoclonal anti-GD2 antibody 14. G2a plus interleukin-2 in children with refractory neuroblastoma: a report of the Children's Cancer Group." Cancer Immunol Immunother; 80:317-33.
- Fujimoto H., Noguchi T., Kobayashi H., Miyachi H., Hashimoto Y. (2006). "Effects of immunomodulatory derivatives of thalidomide (IMiDs) and their analogs on cell-differentiation, cyclooxygenase activity and angiogenesis." Chem Pharm Bull (Tokyo); 54:855–60.
- Funahashi Y., Hernandez S.L., Das I., et al. (2008). "A notch1 ectodomain construct inhibits endothelial notch signaling, tumor growth, and angiogenesis." Cancer Res; 68:4727–35.
- Gao F.B. (2010). "Context-dependent functions of specific microRNAs in neuronal development." Neural Dev, 5:25.
- Gao R.N., Levy I.G., Woods W.G., Coombs B.A., Gaudette L.A., Hill G.B. (1997). "Incidence and mortality of neuroblastoma in Canada compared with other childhood cancers." Cancer Causes and Control; 8:745–754.
- Gaspar N., Hartmann O., Munzer C., Bergeron C., Millot F., Cousin-Lafay L., et al. (2003) Neuroblastoma in adolescents. Cancer; 98:349-55.
- Gasparini G., Longo R., Fanelli M., Teicher B.A. (2005). "Combination of antiangiogenic therapy with other anticancer therapies: results, challenges, and open questions." J Clin Oncol; 23:1295–311.
- Gattolliat C.H., Thomas L., Ciafrè S.A., Meurice G., Le Teuff G., Job B., Richon C., Combaret V., Dessen P., Valteau-Couanet D., May E., Busson P., Douc-Rasy S., Bénard J. (2011).

"Expression of miR-487b and miR-410 encoded by 14q32.31 locus is a prognostic marker in neuroblastoma." Br J Cancer; 105:1352-61.

Gaugler M.H., Neunlist M., Bonnaud S., Aubert P., Benderitter M., Paris F. (2007). "Intestinal epithelial cell dysfunction is mediated by an endothelial-specific radiation-induced bystander effect." Radiat Res 167 : 185-93.

George D.J., Suzuki H., Bova G.S., et Isaacs J.T. (1998). "Mutational analysis of the TrkA gene in prostate cancer." Prostate; 36:172-80.

George R.E., London W.B., Cohn S.L., Maris J.M., Kretschmar C., Diller L., et al. (2005). "Hyperdiploidy plus nonamplified MYCN confers a favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study." J Clin Oncol; 23:6466-73.

Gillard B.K. Thurmon L.T. and Marcus D.M. (1993). Variable subcellular localization of glycosphingolipids. Glycobiology 3, 57-67.

Gilman A.L., Ozkaynak M.F., Matthay K.K., Krailo M., Yu A.L., Gan J., et al. (2009). "Phase I study of ch14.18 with GM-CSF and IL-2 in children with neuroblastoma following autologous bone marrow transplant or stem cell rescue. A report from the Children's Oncology Group." J Clin Oncol; 27:85-91

Gimm O., Greco A., Hoang-Vu C., Dralle H., Pierotti M.A., Eng C. (1999). "Mutational analysis reveals novel sequence variants in NTRK1 in sporadic human medullary thyroid carcinoma." J Clin Endocrinol Metab; 84:2784-87.

Gonda T.A., Varro A., Wang, T.C. et Tycko, B. "Molecular biology of cancer-associated fibroblasts: can these cells be targeted in anti-cancer therapy?" Semin Cell Dev Biol; 21:2–10

Gong H., Pöttgen C., Stüben G., Havers W., Stuschke M., Schweigerer L. (2003). "Arginine deiminase and other antiangiogenic agents inhibit unfavorable neuroblastoma growth: potentiation by irradiation." Int J Cancer; 106:723-8.

Gonzales M.L., LaSalle J.M., (2010). "The role of MeCP2 in brain development and neurodevelopmental disorders." Curr Psychiatry Rep; 12:127-34.

Gross R.W., Farber S., Martin L.W. (1959). Neuroblastoma sympatheticum-a study and report of 217 cases. Pediatrics, 23:1179–1191

Greco A., Mariani C., Miranda C., Pagliardini S., Pierotti M.A. (1993). "Characterization of the NTRK1 genomic region involved in chromosomal rearrangements generating TRK oncogenes." Genomics; 18:397-400.

Grupp S.A., Stern J.W., Bunin N., Nancarrow C., Ross A.A., Mogul M., et al. (2000). "Tandem high-dose therapy in rapid sequence for children with high-risk neuroblastoma." J Clin Oncol; 18:2567-75.

Grynfeld A., Pahlman S., et Axelson H. (2000). « Induced neuroblastoma cell differentiation, associated with transient HES-1 activity and reduced HASH-1 expression, is inhibited by Notch1." Int J Cancer; 88: 401–10.

Gu L., Zhang H., He J., Li J., Huang M. et Zhou M. (2011). "MDM2 regulates MYCN mRNA stabilization and translation in human neuroblastoma cells." Oncogene; 31:1342-53

Gurney J.G., Davis S., Severson R.K., Fang J.Y., Ross J.A., Robison L.L. (1996). "Trends in cancer incidence among children in the US." Cancer; 78:532-41.

Handgretinger R., Baader P., Dopfer R., Klingebiel T., Reuland P., Treuner J., et al. (1992). "A phase I study of neuroblastoma with the anti-ganglioside GD2 antibody 14.G2a." Cancer Immunol Immunother; 35:199-204.

Handgretinger R., Baader P., Dopfer R., Klingebiel T., Reuland P., et al. (1992). "A phase I study of neuroblastoma with the anti-ganglioside GD2 antibody 14.G2a." Cancer Immunol Immunother; 35: 199–204.

Heck J.E., Ritz B., Hung R.J., Hashibe M. et Boffeta P. (2009). "The epidemiology of neuroblastoma: a review." Paediatric and Perinatal Epidemiology; 23 : 125-143

Hedborg F., Fischer-Colbrie R., Östlin N., Sandstedt B., Tran G.B.M., and Maxwell P.H. (2010) Differentiation in Neuroblastoma: Diffusion-Limited Hypoxia Induces Neuro-Endocrine Secretory Protein 55 and Other Markers of a Chromaffin Phenotype. PLoS ONE; 5: e12825.

Hellberg C., Ostman, A. et Heldin, C.H. (2010). "PDGF and vessel maturation." Recent Results Cancer Res; 180:103–114.

Hellborg F., Qian W., Mendez-Vidal C., Asker C., Kost-Alimova M., Wilhelm M. et al. (2001). "Human wig-1, a p53 target gene that encodes a growth inhibitory zinc finger protein." Oncogene; 20: 5466–5474.

Henrich K.O., Bauer T., Schulte J., Ehemann V., Deubzer H., Gogolin S., Muth D., Fischer M., Benner A., König R., Schwab M., Westermann F. (2011). "CAMTA1, a 1p36 tumor suppressor candidate, inhibits growth and activates differentiation programs in neuroblastoma cells." Cancer Res; 71:3142-51.

Henrich K.O., Claas A., Praml C., Benner A., Mollenhauer J., Poustk A.M, Schwa M., Westermann F. (2007). "Allelic variants of CAMTA1 and FLJ10737 within a commonly deleted region at 1p36 in neuroblastoma." Eur J Cancer.; 43(3):607-16.

Henrich K.O., Fischer M., Mertens D., Benner A., Wiedemeyer R., Brors B., et al. (2006). "Reduced expression of CAMTA1 correlates with adverse outcome in neuroblastoma patients." Clin Cancer Res; 12:131–8.

Hirata T., Tatara H., Zaizen Y., Suita S., Matsuzaki A., Ueda K. (1995). "Role of ultrasound in managing neuroblastoma detected by mass screening: a proposed ultrasonographic grading for children with neuroblastoma." J Clin Ultrasound; 23:305-13.

Hirte H., Vergote I.B., Jeffrey J.R., et al. (2006). "A phase III randomized trial of BAY 12-9566 (tanomastat) as maintenance therapy in patients with advanced ovarian cancer responsive to primary surgery and paclitaxel/platinum containing chemotherapy: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study." Gynecol Oncol; 102:300–8.

Hiyama E., Hiyama K., Yokoyama T., Matsuura Y., Piatyszek M.A., Shay J.W. (1995). "Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes." Nat Med; 1:249–55.

Ho R., Eggert A., Hishiki T., Minturn J.E., Ikegaki N., Foster P., Camoratto A.M., Evans A.E., Brodeur G.M. (2002). "Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas." Cancer Res; 62:6462-6.

Ho T.C., Estroff J.A., Kozakewich H., Shamberger R.C., Lillehei C.W., Grier H.E., et al (1993). "Prenatal detection of neuroblastoma: a ten-year experience from the Dana-Farber Cancer Institute and Children's Hospital." Pediatrics; 92:358-64.

Holgersen L.O., Subramanian S., Kirpekar M., Mootabar H., and Marcus J.R. (1996). "Spontaneous resolution of antenatally diagnosed adrenal masses." J Pediatr Surg; 31:153-5.

Hoover M., Bowman L.C., Crawford S.E., Stack C., Donaldson J.S., Grayhack J.J., et al. (1999). "Long-term outcome of patients with intraspinal neuroblastoma." Med Pediatr Oncol; 32:353-9.

Howman-Giles R., Shaw P.J., Uren R.F., Chung D.K. (2007). Neuroblastoma and other neuroendocrine tumors. Semin Nucl Med; 37:286-302.

Hutchison R. (1907). On suprarenal sarcoma in children with metastases to the skull. Q J Med, 1:33–38

Hunt S. (2001). "Technology evaluation: IMC-1C11, ImClone Systems. Curr Opin Mol Ther; 3:418-24.

Ichikawa S., Hirabayashi Y. (1998). "Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis." Trends Cell Biol; 8:198–202.

IGR (2012),

http://www.igr.fr/service.php?p_m=download&p_file=pediatricsite/actu/petitepediatrie.pdf
(Consulté le 31 octobre 2012)

IGR (2004),
http://www.igr.fr/service.php?p_m=download&p_file=pediatricsite/neuro/neuroblastome_pro.pdf (Consulté le 26 juin 2012)

IGR (2006), http://www.igr.fr/?p_m=pediatrie&p_id=2907 (Consulté le 18 février 2013)

IGR (2006), http://www.igr.fr/index.php?p_m=pediatrie&p_id=2869&p_lang=fr (Consulté le 5 avril 2013)

Ingrid R., Huizenga G., Chan A., Koster J., Volckmann R., van Sluis P., Øra I., Versteeg R., Geerts D. (2008). "The MSX1 homeobox transcription factor is a downstream target of PHOX2B and activates the Delta–Notch pathway in neuroblastoma." *Exp Cell Res*; 314:707-19.

Institut Curie, <http://curie.fr/sites/default/files/cp-bagouzamanon-juin2012.pdf> (Consulté le 31 octobre 2012)

Iwahara T. et al. (1997). "Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system." *Oncogene*; 14:439–449.

Jakobsen A.M., Ahlman H., Kolby L., Abrahamsson J., Fischer-Colbrie R., et al. (2003). "NESP55, a novel chromogranin-like peptide, is expressed in endocrine tumours of the pancreas and adrenal medulla but not in ileal carcinoids." *Br J Cancer*; 88:1746–1754

Janoueix-Lerosey I., Lequin D., Brugieres L., Ribeiro A., de Pontual L., Combaret V. et al. (2008). "Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma." *Nature*; 455:967-70.

Jennings R.W., LaQuaglia M.P., Leong K., Hendren W.H., Adzick N.S. (1993). "Fetal neuroblastoma: prenatal diagnosis and natural history." *J Pediatr Surg*; 28:1168-74.

Johansson D., Kosovac E., Moharer J, Ljuslinder I, Brännström T, Johansson A (2009). "Expression of verotoxin-1 receptor Gb3 in breast cancer tissue and verotoxin-1 signal transduction to apoptosis." *BMC Cancer*, 9: 67.

Jones P.A. et Baylin S.B. (2007). "The epigenomics of cancer." *Cell*; 128:683–692.

Joseph J.M., Bouquet C., Opolon P., et al. (2003). "High level of stabilized angiostatin mediated by adenovirus delivery does not impair the growth of human neuroblastoma xenografts." *Cancer Gene Ther*; 10:859–66.

Joshi V.V., Cantor A.B., Brodeur G.M., Look A.T., Shuster J.J., Altshuler G., et al. (1993). "Correlation between morphologic and other prognostic markers of neuroblastoma. A study of histologic grade, DNA index, N-myc gene copy number, and lactic dehydrogenase in patients in the Pediatric Oncology Group." *Cancer*; 71:3173-81.

Kaicker S., McCrudden K.W., Beck L., et al. (2003). "Thalidomide is antiangiogenic in a xenograft model of neuroblastoma." Int J Oncol; 23:1651–5.

Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M. et Lim, C. (1983). "Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxinproducing *Escherichia coli* in stools." Lancet 1, 619–620

Katoh M. (2003). "Identification and characterization of FLJ10737 and CAMTA1 genes on the commonly deleted region of neuroblastoma at human chromosome 1p36.31-p36.23." International Journal of Oncology; 23:12191224.

Katzenstein H.M., Cohn S.L., Shore R.M., Bardo D.M., Haut P.R., Olszewski M., et al. (2004). "Scintigraphic response by 123I-metaiodobenzylguanidine scan correlates with event-free survival in high-risk neuroblastoma." J Clin Oncol; 22:3909-15.

Kelley W.L., (1998). "The J-domain family and the recruitment of chaperone power." Trends Biochem Sci; 23:222–7.

Keusch J.J., Manzella S.M., Nyame K.A., Cummings R.D., Baenziger J.U. (2000). "Cloning of Gb3 synthase, the key enzyme in globo-series glycosphingolipid synthesis, predicts a family of alpha 1, 4-glycosyltransferases conserved in plants, insects, and mammals." J Biol Chem.; 275:25315-21.

Kim E. et Shohet J. (2009). "Targeted Molecular Therapy for Neuroblastoma: The ARF/MDM2/p53 Axis." Oxford journal; 101:1527-9

Kim E.S., Serur A., Huang J., et al. (2002). "Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma." Proc Natl Acad Sci USA; 99:11399–404.

Kim E.S., Soffer S.Z., Huang J., et al. (2002). "Distinct response of experimental neuroblastoma to combination antiangiogenic strategies." J Pediatr Surg; 37:518–22.

Kitlinska J, Abe K, Kuo L, Pons J, Yu M, Li L, et al. (2005). Differential effects of neuropeptide Y on the growth and vascularization of neural crest-derived tumors. Cancer Res, 2005; 65:1719–1728

Klement G., Baruchel S., Rak J., et al. (2000). "Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity." J Clin Invest 2000; 105:R15–24.

Kletzel M., Katzenstein H.M., Haut P.R., Yu A.L., Morgan E., Reynolds M., et al. (2002). "Treatment of high-risk neuroblastoma with triple-tandem high-dose therapy and stem-cell rescue: results of the Chicago Pilot II Study." J Clin Oncol; 20:2284-92.

Knudson A.G. Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 68:820–823.

Kobayashi K., Jakt L.M. et Nishikawa S.I. (2012). "Epigenetic regulation of the neuroblastoma genes, *Arid3b* and *Mycn* Oncogene". Oncogene; doi: 10.1038/onc.2012.285

Kojima Y., Fukumoto S., Furukawa K., Okajima T., Wiels J., Yokoyama K., Suzuki Y., Urano T., Ohta M., Furukawa K. (2000). "Molecular cloning of globotriaosylceramide/CD77 synthase, a glycosyltransferase that initiates the synthesis of globo series glycosphingolipids." J Biol Chem; 275:15152-6.

Kouzarides T. (2007). "Chromatin modifications and their function." Cell;128:693–705

Kovbasnjuk, O., Edidin M., Donowitz M. (2001). "Role of lipid rafts in Shiga toxin 1 interaction with the apical surface of Caco-2 cells." J. Cell Sci, 114:4025-4031.

Kushner B.H., LaQuaglia M.P., Bonilla M.A., Lindsley K., Rosenfield N., Yeh S. et al. (1994). Highly effective induction therapy for stage 4 neuroblastoma in children over 1 year of age. J Clin Oncol; 12:2607-13.

Kushner B.H., Kramer K., LaQuaglia M.P., Cheung N.K. (2003). "Curability of recurrent disseminated disease after surgery alone for local-regional neuroblastoma using intensive chemotherapy and anti-G(D2) immunotherapy." J Pediatr Hematol Oncol; 25:515-9.

La Hulotte, <http://www.lahulotte.asso.fr> (Consulté le 31 octobre 2012)

Lankelma J.M., Voorend D.M., Barwari T., Koetsveld J., Van der Spek A.H., De Porto A.P., Van Rooijen G. et Van Noorden CJ. (2010). "Cathepsin L target in cancer treatment?" Life Sciences; 86:225-33.

Lannert H., Bunning C., Jeckel D., Wieland F.T. (1994). "Lactosylceramide is synthesized in the lumen of the Golgi apparatus." FEBS Lett; 342:91–6.

Lee R.E., Young R.H., et Castleman B. (2002). "James Homer Wright: a biography of the enigmatic creator of the Wright stain on the occasion of its centennial." Am J Surg Pathol 26:88–96

Leung A., Shapiro B., Hattner R., Kim E., De Kraker J., Ghazzar N., et al. (1997). "Specificity of radioiodinated MIBG for neural crest tumors in childhood." J Nucl Med; 38:1352-7

Levy O.A., Lah J.J., Levey A.I. (2002). "Notch signaling inhibits PC12 cell neurite outgrowth via RBP-J-dependent and -independent mechanisms." Dev Neurosci; 24:79–88.

Li B., Carey M. et Workman J.L. (2007). "The role of chromatin during transcription." Cell 128:707–719.

- Li J.Y., Lovisetti-Scamihorn P., Fischer-Colbrie R., Winkler H., Dahlstrom A. (2002). "Distribution and intraneuronal trafficking of a novel member of the chromogranin family, NESP55, in the rat peripheral nervous system." Neuroscience, 110: 731-745.
- Lipska B.S., Drozynska E., Scaruffi P., Tonini G.P., Izycka-Swieszewska E., Zietkiewicz S., Balcerska A., Perek D., Chybicka A., Biernat W., Limon J. (2009). "c.1810C>T polymorphism of NTRK1 gene is associated with reduced survival in neuroblastoma patients." BMC Cancer; 13;9:436.
- Lingwood C.A. (1999). "Verotoxin/globotriaosyl ceramide recognition: angiopathy, angiogenesis and antineoplasia." Biosci Rep.; 19:345-54.
- Lode H.N., Moehler T., Xiang R., Jonczyk A., Gillies S.D., et al. (1999). Synergy between an antiangiogenic integrin alpha v antagonist and an antibody-cytokine fusion protein eradicates spontaneous tumor metastases. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 1591-1596.
- London W.B., Boni L., Simon T., Berthold F., Twist C., Schmidt M.L., et al. (2005). "The role of age in neuroblastoma risk stratification: the German, Italian, and children's oncology group perspectives." Cancer Lett; 228:257-66.
- London W.B., Castleberry R.P., Matthay K.K., Look A.T., Seeger R.C., Shimada H., et al. (2005). "Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group." J Clin Oncol; 23:6459-65.
- Longo L., Panza E., Schena F., Seri M., Devoto M., Romeo G., et al. (2007). "Genetic predisposition to familial neuroblastoma: identification of two novel genomic regions at 2p and 12p." Human Heredity; 63:205–211.
- Look A.T., Hayes F.A., Shuster J.J., Douglass E.C., Castleberry R.P., Bowman L.C., et al. (1991). "Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study." J Clin Oncol; 9:581–91.
- Louise, C.B. et Obrig, T.G. (1991). "Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin, interleukin-1B, and tumor necrosis factor alpha on human vascular endothelial cells *in vitro*." Infect Immun., 59:4173-4179.
- Lu C., Everhart L., Tilan J., Kuo L., Sun C-C.J., Munivenkatappa R.B., Jönsson-Rylander A-C., Sun J., Kuan-Celariar A., Li L. et al. (2010). "Neuropeptide Y and its Y2 receptor: potential targets in neuroblastoma therapy." Oncogene ; 29 :5630–5642.
- Macher B.A. and Sweely C.C. (1978). Glycosphingolipids : structure, biological source, and properties. Methods enzymol 50, 236-251.
- Maden M. (2007). "Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system." Nat Rev Neurosci; 8:755–65.

Majewski S., Szmurlo A., Marczak M., Jablonska S., Bollag W. (1994). "Synergistic effect of retinoids and interferon alpha on tumor-induced angiogenesis: anti-angiogenic effect on HPVharboring tumor-cell lines." Int J Cancer; 57:81–5.

Malmstrom RE. (2001). Vascular pharmacology of BIIIE0246, the first selective non-peptide neuropeptide Y Y(2) receptor antagonist, in vivo. Br J Pharmacol; 133:1073-1080

Mao L., Ding J., Zha Y., Yang L., McCarthy B.A., King W., Cui H., Ding H.F. (2011). "HOXC9 links cell-cycle exit and neuronal differentiation and is a prognostic marker in neuroblastoma." Cancer Res;71:4314-24.

Maris J.M. (2010). Review. Recent advances in Neuroblastoma. N Engl J Med, 362 : 2202-2211.

Maris J.M., Hii G., Gelfand C.A., Varde S., White P.S., Rappaport E., Surrey S., Fortina P. (2005). "Region-specific detection of neuroblastoma loss of heterozygosity at multiple loci simultaneously using a SNP-based tag-array platform." Genome Res; 15:1168-76.

Maris J.M., Matthay K.K. (1999). "Molecular biology of neuroblastoma." J Clin Oncol; 17:2264-79.

Maris J.M., Shusterman S. (2003) Neuroblastoma. In: Cancer Medicine 6. Editors: Kufe DW, Holland JF, Frei E, American Cancer Society. Hamilton, Ont.; Lewiston, NY: BC Decker; pp. 2363-2376.

Maris J.M., Weiss M.J., Guo C., Gerbing R.B., Stram D.O., White P.S., et al. (1997). "Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study." J Clin Oncol; 18(9):1888-99.

Maris J.M., Weiss M.J., Mosse Y., Hii G., Guo C, White P.S., et al. (2002). "Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13." Cancer Res; 62:6651-6658.

Matthay K.K., George R.E., Yu A.L. (2012). "Promising therapeutic targets in neuroblastoma." Clin Cancer Res.; 18:2740-53.

Matthay K.K., Perez C., Seeger R.C., Brodeur G.M., Shimada H., Atkinson J.B., et al. (1998) "Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging: a Children's Cancer Group study". J Clin Oncol; 16:1256-64.

Matthay K.K., Reynolds C.P., Seeger R.C., Shimada H., Adkins E.S., Haas-Kogan D., et al. (2009). "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.

Matthay K.K., Villablanca J.G., Seeger R.C., Stram D.O., Harris R.E., Ramsay N.K., et al. (1999). "Children's Cancer Group. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13- cisretinoic acid." N Engl J Med; 341:1165-73.

McConville C., Reid S., Baskcomb L., Douglas J., Rahman N. (2006). "PHOX2B analysis in non-syndromic neuroblastoma cases shows novel mutations and genotype-phenotype associations". Am J Med Genet A; 140 1297-1301.

McGregor L.M., Rao B.N., Davidoff A.M., Billups C.A., Hongeng S., Santana V.M., et al. (2005). "The impact of early resection of primary neuroblastoma on the survival of children older than 1 year of age with stage 4 disease: the St. Jude children's research hospital experience." Cancer; 104:2837-46.

Meitar D., Crawford S.E., Rademaker A.W., Cohn S.L. (1996). "Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma." J Clin Oncol; 14:405-14.

Mendez Vidal C., Prahl M., Wiman K.G. (2006). "The p53-induced Wig-1 protein binds doublestranded RNAs with structural characteristics of siRNAs and miRNAs." FEBS Lett; 580: 4401-4408.

Mestdagh P., Boström A-K., Impens F., Fredlund E., Van Peer G., De Antonellis P., von Stedingk K., Ghesquière B., Schulte S., Dews M. et al. (2010). "The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF- β pathway in neuroblastoma." Molecular Cell; 40:762-773.

Miao H.Q., Hu K., Jimenez X., Navarro E., Zhang H., Lu D., Ludwig D.L., Balderes P., Zhu Z. (2006). "Potent neutralization of VEGF biological activities with a fully human antibody Fab fragment directed against VEGF receptor 2." Biochem Biophys Res Commun.; 345(1):438-45.

Monclair T., Brodeur G.M., Ambros P.F., Brisse H.J., Cecchetto G., Holmes K., et al. (2009). "The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report." J Clin Oncol; 27:298-303.

Moreau L.A., McGrady P., London W.B., Shimada H., Cohn S.L., Maris J.M., et al. (2006). "Does MYCN amplification manifested as homogeneously staining regions at diagnosis predict a worse outcome in children with neuroblastoma? A Children's Oncology Group study." Clin Cancer Res; 12:5693-7.

Morjani H., Aouali N., Belhoussine R., Veldman R.J., Levade T., Manfait M. (2001). "Elevation of glucosylceramide in multidrug-resistant cancer cells and accumulation in cytoplasmic droplets." Int J Canc, 94 : 157-165.

Morrison S.J., Perez S.E., Qiao Z., et al. (2000). "Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells." Cell; 101:499-510.

Mosse Y.P., Laudenslager M., Khazi D., Carlisle A.J., Winter C.L., Rappaport E., Maris J.M. (2004). "Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma." Am J Hum Genet; 75:727-730.

Mosse, Y.P. et al. (2008). "Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene." Nature; 455:930-935.

Mross K., Frost A., Steinbild S., Hedbom S., Rentschler J., Kaiser R., et al. (2008). "Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of BI 2536, a novel Polo-like kinase 1 inhibitor, in patients with advanced solid tumors." J Clin Oncol; 26:5511-7.

Mueller S. et Matthay K.K. (2009). "Neuroblastoma: biology and staging", Curr Oncol Rep; 11:431-8.

Muotri A.R., Marchetto M.C., Coufal N.G., Oefner R., Yeo G., et al. (2011). "L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2." Nature; 468: 443–446.

Nagase T., Ishikawa K., Suyama M., Kikuno R., Hirosawa M., Miyajima N., et al. (1998). "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro." DNA Res; 5:355–64.

Nakagawara A. et Ohira M. (2004). "Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: neuroblastoma as a model." Cancer Lett; 204:213-224.

Nakagawara A., Arima M., Azar C.G., Scavarda N.J., Brodeur G.M. (1992). "Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas." Cancer Res; 52:1364-8.

Nakagawara A., Arima-Nakagawara M., Scavarda N.J., Azar C.G., Cantor A.B., Brodeur G.M. (1993). "Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma." N Engl J Med; 328:847-54.

Nickerson H.J., Matthay K.K., Seeger R.C., Brodeur G.M., Shimada H., Perez C., et al. (2000). "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.

Nitschke R., Smith E.I., Altshuler G., Altmiller D., Shuster J., Green A., et al. (1991). "Postoperative treatment of nonmetastatic visible residual neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study." J Clin Oncol; 9:1181-8.

Norris M.D., Bordow S.B., Haber P.S., Marshall G.M., Kavallaris M., Madafiglio J., et al. (1997). "Evidence that the MYC Noncogene regulates MRP gene expression in neuroblastoma." Eur J Cancer; 33:1911–6.

Norris M.D., Bordow S.B., Marshall G.M., Haber P.S., Cohn S.L., Haber M. (1996). "Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma." N Engl J Med; 334: 231-8.

Nowak K., Kerl K., Fehr D., Kramps C., Gessner C., Killmer K., Samans B., Berwanger B., Christiansen H., Lutz W. (2006). "BMI1 is a target gene of E2F-1 and is strongly expressed in primary neuroblastomas." Nucleic Acids Res; 34:1745-54.

Obrig T.G., Louise C.B., Lingwood C.A., Boyd B., Barley-Maloney L., Daniel T.O. (1993). "Endothelial heterogeneity in Shiga toxin receptors and responses." J Biol Chem, 268:15484-15488.

Ogawa O., et al. (1993). "Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour." Nature; 362:749–751.

Okubo J., Takita J., Chen Y., Oki K., Nishimura R., Kato M., Sanada M., Hiwatari M., Hayashi Y., Igarashi T., Ogawa S. (2012). "Aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma." Oncogene; doi: 10.1038/onc.2011.616.

Okuda T., Tokuda N., Numata S., Ito M., Ohta M., Kawamura K., Wiels J., Urano T., Tajima O., Furukawa K., et al. (2006). "Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins." J Biol Chem, 281:10230-10235.

Ootsuka S., Asami S., Sasaki T., Yoshida Y., Nemoto N., Shichino H., et al. (2008). Useful markers for detecting minimal residual disease in cases of neuroblastoma. Biol Pharm Bull; 31:1071-4.

Orphanet (2013)

http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education_AboutRareDiseases.php?lng=FR (Consulté le 5 avril 2013)

Park J.R., Eggert A., et Caron H. (2008). "Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment." Pediatr Clin North Am; 55:97-120.

Pepper W.A. (1901). A study of congenital sarcoma of the liver and suprarenal with report of a case. Am J Med Sci, 121:287–299

Perel Y., Amrein L., Dobremez E., Rivel J., Daniel J.Y., Landry M. (2002). "Galanin and galanin receptor expression in neuroblastic tumours: correlation with their differentiation status." Br J Cancer; 86:117-22.

- Pérel Y., Valteau-Couanet D., Michon J., Lavrand F., Coze C., Bergeron C., Notz A., Plantaz D., Chastagner P., Bernard F., Thomas C., Rubie H. (2004). "Prognosis of neuroblastoma in childhood. Methods of assessment and clinical use." Archives de pédiatrie **11**, 834-842
- Perri P., Bachetti T., Longo L., Matera I., Seri M., Tonini G.P., Ceccherini I. (2007). "Genetic Predisposition to Familial Neuroblastoma: Identification of Two Novel Genomic Regions at 2p and 12p." Hum Hered; **63**:205-211
- Perri P., Longo L., Cusano R., McConville C.M., Rees S.A., Devoto M., et al. (2002). "Weak linkage at 4p16 to predisposition for human neuroblastoma." Oncogene; **21**:8356-8360
- Petty J.K., Bensard D.D., Partrick D.A., Hendrickson R.J., Albano E.A., Karrer F.M. (2006). "Resection of neurogenic tumors in children: is thoracoscopy superior to thoracotomy?" J Am Coll Surg; **203**:699-703.
- Pezzolo A., Parodi F., Corrias M.V., Cinti R., Gambini C., Pistoia V. (2007) "Tumor origin of endothelial cells in human neuroblastoma." J Clin Oncol; **25**:376-83.
- Piccardo A., Lopci E., Conte M., Garaventa A., Foppiani L., Altrinetti V., Nanni C., Bianchi P., Cistaro A., Sorrentino S., Cabria M., Pession A., Puntoni M., Villavecchia G., Fanti S. (2012). "Comparison of 18F-dopa PET/CT and 123I-MIBG scintigraphy in stage 3 and 4 neuroblastoma: a pilot study." Eur J Nucl Med Mol Imaging; **39**:57-71.
- Ponomarev E.D., Veremeyko T., Barteneva N.S. (2011). "Visualization and quantitation of the expression of microRNAs and their target genes in neuroblastoma single cells using imaging cytometry." BMC Res Notes; **4**:517.
- Prewett M., Huber J., Li Y., Santiago A., O'Connor W., King K., Overholser J., Hooper A., Pytowski B., Witte L., Bohlen P., Hicklin D.J. (1999). "Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors." Cancer Res ; **59**:5209-18.
- Pritchard J., Cotterill S.J., Germond S.M., Imeson J., De Kraker J., Jones D.R. (2005). "High dose melphalan in the treatment of advanced neuroblastoma: results of a randomised trial (ENSG-1) by the European Neuroblastoma Study Group." Pediatr Blood Cancer; **44**:348-57.
- Raabe E.H., Laudenslager M., Winter C., Wasserman N., Cole K., Laquaglia M., Maris D.J., Mosse Y.P., Maris J.M. (2008). "Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in neuroblastoma." Oncogene, **27**:469-76
- Raible D.W., (2006). "Development of the neural crest: achieving specificity in regulatory pathways." Curr Opin Cell Biol,**18**: 698-703.

Ramos C., et Robert B. (2005). "Msh/Msx gene family in neural development." Trends Genet; 21:624-632.

Ribatti D., Alessandri G., Baronio M., et al. (2001). "Inhibition of neuroblastoma-induced angiogenesis by fenretinide." Int J Cancer; 94:314–21.

Ribatti D., Vacca A., Nico B., De Falco G., Giuseppe M.P., Ponzoni M. (2002). "Angiogenesis and anti-angiogenesis in neuroblastoma." Eur J Cancer; 38:750–7.

Ries L., Eisner M., Kosary C., Hankey B., Miller B., Clegg L. et al. (2005). SEER Cancer Statistic review, 1975-2002. Bethesda, MD : Nationale Cancer Institute.

Rodríguez-Paredes M. et Esteller M. (2011). "Cancer epigenetics reaches mainstream oncology." Nat Med; 17:330-9.

Rössler J., Breit S., Havers W., Schweigerer L. (1999). "Vascular endothelial growth factor expression in human neuroblastoma: up-regulation by hypoxia." Int J Cancer; 81:113-7

Rössler J., Taylor M., Geoerger B., Farace F, Lagodny J., Peschka-Sü R., Niemeyer C.M., Vassal G. (2008). "Angiogenesis as a target in neuroblastoma." Eur J Cancer; 1645-56.

Rothenberg A.B., Berdon W.E., D'angio G. J., Yamashiro D.J., Cowles R.A. (2009). "Neuroblastoma—remembering the three physicians who described it a century ago: James Homer Wright, William Pepper, and Robert Hutchison." Pediatr Radiol ; 39:155-160

Rouleau C., Smale R., Sancho J., Fu Y.S., Kurtzberg L., Weber W., Kruger A., Jones C., Roth S., Bormann C., Dunham S., Krumbholz R., Curiel M., Wallar G., Mascarello J., Campos-Rivera J., Horten B., Schmid S., Miller G., Teicher B.A. (2011). "Endosialin: a novel malignant cell therapeutic target for neuroblastoma." Int J Oncol; 39:841-51

Rubie H., Hartmann O., Giron A., Lemoine G., Gruner M., Brugieres L., et al. (1991). "Nonmetastatic thoracic neuroblastomas: a review of 40 cases." Med Pediatr Oncol; 19:253-7.

Saleh M.N., Khazaeli M.B., Wheeler R.H., Dropcho E., Liu T., et al. (1992). "Phase I trial of the murine monoclonal anti-GD2 antibody 14G2a in metastatic melanoma." Cancer Res; 52: 4342-4347.

Sano H., Bonadio J., Gerbing R.B., London W.B., Matthay K.K., Lukens J.N., et al. (2006). "International neuroblastoma pathology classification adds independent prognostic information beyond the prognostic contribution of age." Eur J Cancer; 42:1113-9.

Sartelet H., Grossi L., Pasquier D., Combaret V., Bouvier R., Ranchere D., et al. (2002). "Detection of N-myc amplification by FISH in immature areas of fixed neuroblastomas: more efficient than Southern blot/PCR." J Pathol; 198:83–91.

Sauka-Spengler T., et Bronner-Fraser M. (2008). "A gene regulatory network orchestrates neural crest formation." Nat Rev Mol Cell Biol; 9:557–568.

Scaruffi P., Cusano R., Dagnino M., et Tonini G.P. (1999). "Detection of DNA polymorphisms and point mutations of high-affinity nerve growth factor receptor (TrkA) in human neuroblastoma." Int J Oncol; 14:935-8..

Schleiermacher G., Rubie H., Hartmann O., Bergeron C., Chastagner P., Mechinaud F., et al. (2003). "Neuroblastoma Study Group of the French Society of Paediatric Oncology. Treatment of stage 4s neuroblastoma—report of 10 years' experience of the French Society of Paediatric Oncology (SFOP)." Br J Cancer; 89:470-6.

Schmidt M., Simon T., Hero B., Eschner W., Dietlein M., Sudbrock F., Bongartz R., Berthold F., Schicha H. (2006). "Is there a benefit of 131 I-MIBG therapy in the treatment of children with stage 4 neuroblastoma? A retrospective evaluation of The German Neuroblastoma Trial NB97 and implications for The German Neuroblastoma Trial NB2004." Nuklearmedizin; 45:145-51

Schneiderman J., London W.B., Brodeur G.M., Castleberry R.P., Look A.T., Cohn S.L. (2008). "Clinical significance of MYCN amplification and ploidy in favorable-stage neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group." J Clin Oncol; 26:913-8.

Schönherr C., Ruuth K., Kamaraj S., Wang C.L., Yang H.L., Combaret V., Djos A., Martinsson T., Christensen J.G., Palmer R.H., Hallberg B. (2012). "Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) regulates initiation of transcription of MYCN in neuroblastoma cells." Oncogene; doi: 10.1038/onc.2012.12.

Schramm A., von Schuetz V., Christiansen H., Havers W., Papoutsis M., Wilting J., Schweigerer L. (2005). "High activin A-expression in human neuroblastoma: suppression of malignant potential and correlation with favourable clinical outcome." Oncogene; 24:680-7

Schulz G., Cheresch D.A., Varki N.M., Yu A., Staffileno L.K., Reisfeld R.A. (1984). "Detection of ganglioside GD2 in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients." Cancer Res; 44: 5914-5920.

Schwarzmann G, Sandhoff K. (1990). Metabolism and intracellular transport of glycosphingolipids. Biochemistry; 29:10865-71.

Seegerstrom L., Fuchs D., Backman U., Holmquist K., Christofferson R., Azarbayjani F. "The anti-VEGF antibody bevacizumab potently reduces the growth rate of high-risk neuroblastoma xenografts." Pediatr Res; 60: 576-81.

Semenza G.L. (2008). A new weapon for attacking tumor blood vessels. N Engl J Med 358, 2066-2067.

Sherr C.J. (2006) . "Divorcing ARF and p53: an unsettled case." Nat Rev Cancer; 6 (9): 663-673

Shimada H., Ambros I.M., Dehner L.P., Hata J, Joshi V.V., Roald B., et al. (1999). "The international neuroblastoma pathology classification (the Shimada system)." Cancer; 86:364-72.

Shimada H., Chatten J., Newton W.A. Jr, Sachs N., Hamoudi A.B., Chiba T., et al. (1984). Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. J Natl Cancer Inst; 73:405-16.

Shohet J.M., Hicks M.J., Plon S.E., Burlingame S.M., Stuart S., Chen S.Y., et al. (2002). "Minichromosome maintenance protein MCM7 is a direct target of the MYCN transcription factor in neuroblastoma." Cancer Res; 62:1123-8.

Shu L. and Shayman J.A. (2007). Caveolin-associated accumulation of globotriaosylceramide in the vascular endothelium of alpha-galactosidase null mice. J Biol Chem 282, 20960-20967

Shuster J.J., McWilliams N.B., Castleberry R., Nitschke R., Smith E.I., Altshuler G., et al. (1992). "Serum lactate dehydrogenase in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group recursive partitioning study." Am J Clin Oncol; 15:295-303.

Simon T., Hero B., Hunneman D.H., Berthold F. (2003). "Tumour markers are poor predictors for relapse or progression in neuroblastoma." Eur J Cancer; 39:1899-903.

Simons and Toomre D. (2000). Lipids rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Bio 1, 31-39

Singh R.K., Iyappan S., et Scheffner M. (2007). "Hetero-oligomerization with MdmX rescues the ubiquitin/Nedd8 ligase activity of RING finger mutants of Mdm2." J Biol Chem; 282: 10901 – 10907 .

Sjoberg E.R., Manzi A.E., Khoo K.H., Dell A., Varki A. (1992). "Structural and immunological characterization of O-acetylated GD2. Evidence that GD2 is an acceptor for ganglioside O-acetyltransferase in human melanoma cells." J Biol Chem; 267: 16200-16211.

Skrzydowska E., Sulkowska M., Koda M. et Sulkowski S. (2005). "Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis." World Journal of Gastroenterology; 11:1251-1266

Spix C., Pastore G., Sankila R., Stiller C.A., Steliarova-Foucher E. (2006). "Neuroblastoma incidence and survival in European children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project." European Journal of Cancer; 42:2081-2091

Sprong H., Kruithof B., Leijendekker R., Slot J.W., vanMeer G., van der Sluijs P. (1998). "UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase is a class I integral membrane protein of the endoplasmic reticulum." J Biol Chem; 273:25880–8.

Stacker S.A., Caesar C., Baldwin M.E., Thornton G.E., Williams R.A., Prevo R., Jackson D.G., Nishikawa S., Kubo H., Achen M.G. (2001). "VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics." Nat Med; 7:186-91.

Steffensen R., Carlier K., Wiels J., Levery S.B., Stroud M., Cedergren B., Nilsson Sojka B., Bennett E.P., Jersild C., Clausen H. (2000). "Cloning and expression of the histo-blood group Pk UDP-galactose: Ga1beta-4G1cbeta1-cer alpha1, 4-galactosyltransferase. Molecular genetic basis of the p phenotype." J Biol Chem; 275:16723-9.

Stricklett P.K., Hughes A.K., Kohan D.E. (2005). "Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase ameliorates cytokine up-regulated shigatoxin-1 toxicity in human brain microvascular endothelial cells." J Infect Dis, 191:461-471.

Stupack D.G. et Cheresch D.A. (2002). "Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival." J Cell Sci; 115:3729-3738.

Stupack D.G., Puente X.S., Boutsaboualoy S., Storgard C.M. et Cheresch D.A. (2001). "Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins." J Cell Biol; 155:459-470

Sund M., Hamano Y., Sugimoto H., Sudhakar A., Soubasakos M., Yerramalla U. et al. (2005). "Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endotheliumspecific tumor suppressors." Proc Natl Acad Sci USA; 102:2934-2939.

Suzuki M.M. et Bird A. (2008). "DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics." Nat Rev Genet; 9: 465–476.

Suzuki T., Bogenmann E., Shimada H., Stram D., Seeger R.C. (1993). "Lack of high-affinity nerve growth factor receptors in aggressive neuroblastomas." J Natl Cancer Inst; 85:377–84.

Svensson A., Bäckman U., Jonsson E., Larsson R., Christofferson R. (2002). "CHS 828 inhibits neuroblastoma growth in mice alone and in combination with antiangiogenic drugs." Pediatr Res; 51:607-11.

Swarbrick A., Woods S.L., Shaw A., Balakrishnan A., Phua Y., Nguyen A., et al. (2010)." miR-380-5p represses p53 to control cellular survival and is associated with poor outcome in MYCN-amplified neuroblastoma." Nature Medicine; 16 1134-1140.

Takeda O., Handa M., Uehara T., Maseki N., Sakashita A., Sakurai M., et al. (1996). "An increased NM23H1 copy number may be a poor prognostic factor independent of LOH on 1p in neuroblastomas." Br J Cancer; 74:1620-6.

Tonini G.P., Boni L., Pession A., Rogers D., Iolascon A., Basso G., et al. (1997). "MYCN oncogene amplification in neuroblastoma is associated with worse prognosis, except in stage 4s: the Italian experience with 295 children." J Clin Oncol; 15:85-93.

Tonini G.P., Lo Cunsolo C., Cusano R., Iolascon A., Dagnino M., Conte M., et al. (1997). "Loss of heterozygosity for chromosome 1p in familial neuroblastoma." European Journal of Cancer; 33:1953-1956.

Tonini G.P., Longo L., Coco S., Perri P. (2003). "Familial neuroblastoma: a complex heritable disease." Cancer Letters; 197:41-45.

Trochet D., Bourdeaut F., Janoueix-Lerosey I., Deville A., De Pontual L., Schleiermacher G., Coze C., Philip N., Frebourg T., Munnich A., Lyonnet S., Delattre O., Amiel J. (2004). "Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma". Am. J. Hum. Genet.; 74:761-764.

Valsesia-Wittmann S., Magdeleine M., Dupasquier S., Garin E., Jallas A.C., Combaret V., Krause A., Leissner P., Puisieux A. (2004). "Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells." Cancer Cell; 6:625-30

Van de Kar N.C., Monnens L.A., Karmali M.A., van Hinsbergh V.W. (1992). "Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: Implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome." Blood, 80:2755–2764.

Van Limpt V., Schramm A., Lakeman A., van Sluis P., Chan A., van Noesel M., Baas F., Caron H., Eggert A., Versteeg R. (2004). "The Phox2B homeobox gene is mutated in sporadic." Oncogene; 23:9280-8.

Veldman J., Klappe K., Hinrichs J., Hummel I., van der Schaaf G., Sietsma, H., Kok, J. (2002) "Altered sphingolipid metabolism in multidrug-resistant ovarian cancer cells is due to uncoupling of glycolipid biosynthesis in the Golgi apparatus." FASEB J., 16 : 1111-1113.

Verissimo C.S., Molenaar J.J., Fitzsimons C.P. et Vreugdenhil E. (2011). "Neuroblastoma therapy: what is in the pipeline?" Endocrine-Related Cancer; 18:R213-R231

Verissimo C.S., Molenaar J.J., Meerman J., Puigvert J.C., Lamers F., Koster J., et al. (2010). "Silencing of the microtubule-associated proteins doublecortin-like and doublecortin-like kinase-long induces apoptosis in neuroblastoma cells." Endocrine-Related Cancer; 17:399-414.

- Vilborg A., Glahder J.A., Wilhelm M.T., Bersani C., Corcoran M., Mahmoudi S. et al. (2009). "The p53 target Wig-1 regulates p53 mRNA stability through an AU-rich element." Proc Natl Acad Sci USA; 106: 15756-15761
- Wachowiak R., Thieltges S., Rawnaq T., Kaifi J.T., Fiegel H., Metzger R., et al. (2010). "Y-Box-binding Protein-1 is a Potential Novel Tumour Marker for Neuroblastoma." Anticancer Res, 1239-42.
- Waddington C.H. (1942). "The epigenotype." Endeavour; 1:18–20.
- Wang G.G., Cai L., Pasillas M.P. and Kamps M.P. (2007). "NUP98–NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis." Nat Cell Biol; 9:804-812.
- Weier H.U., Rhein A.P., Shadravan F., Collins C., and Polikoff D. (1995). "Rapid physical mapping of the human trk protooncogene (NTRK1) to human chromosome 1q21-q22 by P1 clone selection, fluorescence in situ hybridization (FISH) and computer-assisted microscopy." Genomics; 26:390-3.
- Weis S.M. et Cheresch, D.A. (2005). "Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability." Nature; 437:497-504.
- Weis S.M., Cheresch D.A. (2011). "Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets." Nature Medicine 17:1359-1370
- Weninger W., Rendl M., Mildner M., and Tschachler E. (1998). "Retinoids downregulate vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor production by normal human keratinocytes." J Invest Dermatol;111:907–11.
- Won J.S., Singh A.K., and Singh I. (2007). "Lactosylceramide: a lipid second messenger in neuroinflammatory disease." J Neurochem; 103:180–91
- Wright J.H. (1910). Neurocytoma or neuroblastoma: a kind of tumor not generally recognized. J Exp Med, 12:556–561
- Xing, F., Saidou J. and Watabe K. (2010). "Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment." Front Biosci; 15:166-179.
- Yamashiro D.J., Nakagawara A., Ikegaki N., Liu X.G., and Brodeur G.M. (1996). "Expression of TrkC in favorable human neuroblastomas." Oncogene; 12:37-41.
- Yang Q., Tian Y., Liu S., et al. (2007). "Thrombospondin-1 peptide ABT- 510 combined with valproic acid is an effective antiangiogenesis strategy in neuroblastoma." Cancer Res; 67:1716-24.
- Yang Q.W., Liu S., Tian Y., et al. (2003). "Methylation-associated silencing of the thrombospondin-1 gene in human neuroblastoma." Cancer Res; 63:6299–310.

Ye J.N., et Cheung N.K. (1992). "A novel O-acetylated ganglioside detected by anti-GD2 monoclonal antibodies." Int J Cancer; 50: 197–201.

Yoshida S., Fukumoto S., Kawaguchi H., Sato S., Ueda R., Furukawa K. (2001). "Ganglioside G(D2) in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis." Cancer Res 61 : 4244-52.

Yu A.L., Gilman A.L., Ozkaynak M.F., London S., Kreissman H.X., Chen K.K., et al (2009). "2009 ASCO Annual Meeting. A phase III randomized trial of the chimeric anti-GD2 antibody ch14.18 with GM-CSF and IL2 as immunotherapy following dose intensive chemotherapy for high-risk neuroblastoma: Children's Oncology Group (COG) study ANBL0032", J Clin Oncol; 27:15s.

Yu A.L., Gilman A.L., Ozkaynak M.F., London W.B., Kreissman S.G., Chen H.X., et al.(2010). "Children's Oncology Group. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma." N Engl J Med; 363:1324-34.

Yuki N., Yamada M., Tagawa Y., Takahashi H., and Handa S. (1997). "Pathogenesis of the neurotoxicity caused by anti-GD2 antibody therapy." J Neurol Sci; 149: 127-130.

Zage P.E., Kletzel M., Murray K., Marcus R., Castleberry R., Zhang Y., et al. (2008). "Children's Oncology Group. Outcomes of the POG 9340/9341/9342 trials for children with high-risk neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group." Pediatr Blood Cancer ; 51:747-53.

Zeng Y., Fest S., Kunert R., Katinger H., Pistoia V., et al. (2005). "Antineuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice." Mol Immunol; 42: 1311-1319.

Zheng X., Chou P.M., Mirkin B.L. et Rebbaa A. (2004). "Senescence-initiated reversal of drug resistance: specific role of cathepsin L." Cancer Res; 64 1773-1780.

Zheng X., Chu F., Chou P.M., Gallati C., Dier U., Mirkin B.L., Mousa S.A. et Rebbaa A. (2009). "Cathepsin L inhibition suppresses drug resistance in vitro and in vivo: a putative mechanism. American Journal of Physiology." Cell Physiology; 10.1152/ajpcell.00082.2008.

Annexes

Annexe 1 : Article : Anti-Gb3 Monoclonal Antibody Inhibits Angiogenesis and Tumor Development. Desselle A., Chaumette T., Gaugler M.H., Cochonneau D., Fleurence J., Dubois N., Hulin P., Aubry J., Birklé S., Paris F. (2012). Anti-Gb3 monoclonal antibody inhibits angiogenesis and tumor development. PLoS ONE 7: e45423. Dans cet article j'ai mis en évidence les différentes voies de signalisations cellulaires précoces impliquées dans l'effet cytostatique du 3E2.

Annexe 2 : Author's view : Inhibition of tumor angiogenesis by globotriaosyl ceramide Gb3 immunotargeting. Stéphane Birklé, Ariane Desselle, Tanguy Chaumette, Marie-Hélène Gaugler, Denis Cochonneau, Julien Fleurence, Nolwenn Dubois, Philippe Hulin, Jacques Aubry, and François Paris

Anti-Gb3 Monoclonal Antibody Inhibits Angiogenesis and Tumor Development

Ariane Desselle^{1,2,3,9}, Tanguy Chaumette^{1,2,3,9}, Marie-Hélène Gaugler^{1,2,3,4}, Denis Cochonneau^{1,2,3}, Julien Fleurence^{1,2,3}, Nolwenn Dubois^{1,2,3,6}, Philippe Hulin⁵, Jacques Aubry^{1,2,3}, Stéphane Birklé^{1,2,3,†}, François Paris^{1,2,3,6,*}

1 Inserm, UMR892, Nantes, France, **2** Université de Nantes, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Nantes, France, **3** CNRS, UMR 6299, Nantes, France, **4** Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, Fontenay-aux-Roses, France, **5** Inserm, SFR Santé UMS 016, Nantes, France, **6** Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain, France

Abstract

Inhibiting the growth of tumor vasculature represents one of the relevant strategies against tumor progression. Between all the different pro-angiogenic molecular targets, plasma membrane glycosphingolipids have been under-investigated. In this present study, we explore the anti-angiogenic therapeutic advantage of a tumor immunotherapy targeting the globotriaosylceramide Gb3. In this purpose, a monoclonal antibody against Gb3, named 3E2 was developed and characterized. We first demonstrate that Gb3 is over-expressed in proliferative endothelial cells relative to quiescent cells. Then, we demonstrate that 3E2 inhibits endothelial cell proliferation *in vitro* by slowing endothelial cell proliferation and by increasing mitosis duration. Antibody 3E2 is further effective in inhibiting *ex vivo* angiogenesis in aorta ring assays. Moreover, 3E2 treatment inhibits NXS2 neuroblastoma development and liver metastases spreading in A/J mice. Immunohistology examination of the NXS2 metastases shows that only endothelial cells, but not cancer cells express Gb3. Finally, 3E2 treatment diminishes tumor vessels density, proving a specific therapeutic action of our monoclonal antibody to tumor vasculature. Our study demonstrates that Gb3 is a viable alternative target for immunotherapy and angiogenesis inhibition.

Citation: Desselle A, Chaumette T, Gaugler M-H, Cochonneau D, Fleurence J, et al. (2012) Anti-Gb3 Monoclonal Antibody Inhibits Angiogenesis and Tumor Development. PLoS ONE 7(11): e45423. doi:10.1371/journal.pone.0045423

Editor: Christina Lynn Addison, Ottawa Hospital Research Institute, Canada

Received: May 5, 2012; **Accepted:** August 16, 2012; **Published:** November 26, 2012

Copyright: © 2012 Desselle et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The present work was supported by La Ligue Nationale Contre le Cancer and the Fondation de l'Université de Nantes (Air Lichens). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: francois.paris@inserm.fr

⁹ These authors contributed equally to this work.

[†] These authors also contributed equally to this work.

Introduction

Anti-angiogenic therapy, including monoclonal antibodies (mAbs) and small molecule inhibitors, is considered a relevant approach that limits tumor progression by inhibiting tumor vasculature development [1]. Therapeutic mAbs alone or in combination with other drugs are already proposed in clinical use to target pro-angiogenic molecular pathways. After a period of benefit, however, those antibodies, such as Bevacizumab, fail to produce a lasting clinical response in most patients, due to compensatory mechanisms leading to adaptive resistance [2], giving evidence for an urgent need to develop new anti-angiogenic therapies targeting new molecular targets.

The anti-angiogenesis therapies mainly focus on blocking growth cytokines or related receptors, or over-expressed proteins anchored in the endothelial cell membrane. However, mAbs recognizing cell surface glycosphingolipids (GSLs) have recently been proven to be effective for adjunct cancer therapy targets [3]. GSLs are expressed mainly at the outer leaflet of the plasma membrane [4]. They consist of a hydrophobic ceramide membrane anchor and a hydrophilic cell surface-exposed oligosaccharide chain, accessible to cell surface recognition molecules, making

them candidate targets for oncological applications [3]. In particular, globotriaosylceramide Gb3, a neutral GSL, has been identified as three different entities according to the cell type: the rare Pk blood group antigen on erythrocytes [5], CD77 differentiation antigen on germinal B lymphocytes [6], and the receptor of the bacterial toxin of the Shiga family, also called verotoxin on small intestine epithelial cells [7]. Gb3 is also found in the kidney glomerulus of the very young [8] and in several tumors, such as Burkitt's lymphoma [9], and colorectal, breast, pancreatic and ovarian carcinomas [10,11,12,13,14]. Gb3 is expressed not only in tumor cells, but also in the vasculature surrounding and within the tumor [15]. This latter finding may reflect an over-expression of Gb3, especially in angiogenic endothelial cells, which could be targeted by an anti-cancer agent.

Because Gb3 is a shiga toxin receptor, several engineered shiga toxin Gb3 ligands are currently under investigation as potential anti-cancer agents [16]. Its relevance for clinical trials, however, may be limited due to the toxin's residual immunogenicity [17]. Furthermore, a high prevalence of anti-shiga toxin antibodies was detected in healthy populations [18], which could be associated with population immunity to systemic shiga toxin-associated

disease [18]. Due to these limitations, the use of mAbs specific to Gb3 would be more appropriate in patients.

In this study, we report the generation of a mouse IgM mAb specific for Gb3 named 3E2. We demonstrate that Gb3 is over-expressed in proliferating endothelial cells in culture. Furthermore this novel Mab 3E2 is shown to inhibit angiogenesis *in vitro* and *ex vivo* using a mouse aorta ring test. Finally, its ability to block tumor angiogenesis and subsequently tumor growth was evaluated successfully *in vivo* in a syngeneic animal model. Thus, the use of anti-Gb3 mAbs could represent new therapeutic strategies for anti-angiogenic therapies.

Materials and Methods

Cell lines, antibodies and lipids

Human microvascular endothelial HMEC-1 cells and murine neuroblastoma NXS2 cells respectively provided by F. J. Candal (Center for Disease Control, Atlanta, USA) and by Pr. Lode (Universitätsklinikum Greifswald, Germany) were grown as previously described [19,20]. Human neuroblastoma IMR32 and Burkitt's lymphoma Raji cells were grown in RPMI 1640 with 10% fetal Calf serum as described [21,22]. T84 cells were grown in DMEM:F12 (1:1, Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated FBS as described [23]. The rat anti-Gb3 mAb (clone 38.13; Beckman Coulter) and the GD2 mAb 14G2a (BD Biosciences) and their isotypic controls (clone 11E10; Beckman Coulter) were diluted in PBS. Rat brain gangliosides extract, the neutral GSLs mixture and purified-Gb3 were purchased from Matreya LLC. Sphingosine-1-phosphate (S1P; Biomol) was rehydrated in PET diluent as previously described [19].

Hybridoma generation

Murine 3E2 mAb (IgM, κ) specific to Gb3 was established in our laboratory. 6-week old Balb/c mice (Janvier) were immunized by intra-peritoneal injection of proliferating primary human lung microvascular endothelial cells HMVEC-L (Lonza) grown in presence of human colon T84 adenocarcinoma cells (ATCC) in culture condition previously described [23]. Mice were immunized with 5 doses of 2.5×10^6 HMVEC-L cells every 10 weeks and one booster shot of 1.5×10^6 cells. Splenocytes were fused with myeloma cells SP2/O-Ag14 using polyethylene glycol. Hybridoma fusions were screened on either proliferating or non-proliferating endothelial cells. After limiting dilution, 3E2 mAb was affinity-purified from culture supernatants by HiTrap Protein L column (GE Healthcare).

Glycolipids extraction HPTLC analysis and immunostaining

Glycolipids were extracted and analyzed according to Ladish *et al.* [24]. The recovered glycolipids (2.5 mg of protein equivalent per sample) were dissolved in a 1:2 v/v chloroform-methanol solution and separated on a 55:45:10 v/v/v chloroform-methanol-0.2% aqueous CaCl_2 solution on thin-layer chromatography plates (HPTLC; Merck). Glycolipids bands detected after orcinol spray were quantified by densitometry (ImageQuant, GE Healthcare). GSLs were identified by the nomenclature of Svennerholm [25]. Then, TLC plates were fixed by 0.1% polyisobutylmethacrylate in hexane, saturated with 1% PBS-BSA and overlaid with antibodies overnight at 4°C (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 0.1% PBS/BSA). mAb binding was detected by 4-chloro-1-naphthol solution (Sigma) after incubation with biotinylated anti-mouse immunoglobulin (Invitrogen; 1:2,000), and streptavidin-horseradish peroxidase complex (Beckman Coulter; 1:2,000) for 1 h each.

^3H -thymidine incorporation

16 h after treatment, HMEC-1 were incubated with accurate medium containing ^3H -thymidine (1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) for 8 h. Cells were then processed as described [19].

Flow cytometry

To detect cell-surface antigens, 2×10^5 cells were incubated at 4°C with 3E2 or 11E10 (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 60 min, pelleted at 300 g for 1 min and fixed for 15 min with 4% paraformaldehyde. Antibody binding was detected by stepwise incubation at 4°C with biotinylated chain-specific anti-mouse IgM (Jackson ImmunoResearch; 1:500), then by a FITC-streptavidin complex (Beckman Coulter; 1:1000) for 30 min each. Cell fluorescence (10^4 cells) was analyzed in a FACScan running Cell Quest Pro (BD Bioscience).

Real-time quantitative PCR

Cellular RNAs from HMEC-1 cells were isolated using the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instruction. One μg of total RNA was Oligo(dT) primed and first-strand cDNA synthesis was performed according to the manufacturer's guidelines (Super ScriptTM III RNase H Reverse Transcriptase, Invitrogen). mRNA expression quantifications expression were analysed by real-time quantitative PCR on 50 ng of cDNA in 50 μl SYBR Green PCR Master Mix mix (Roche) incubated with the Gb3 synthase primers described [26]. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was chosen as endogenous reference for normalisation. Relative gene expression was calculated using the comparative Ct method [27].

Immunocytochemistry

HMEC-1 seeded on coverslips were incubated at 4°C with 3E2 (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 45 min, and fixed for 15 min with 4% paraformaldehyde. The mAb binding was stepwise incubated at 4°C with biotinylated anti-mouse IgM (Jackson ImmunoResearch; 1:400) for 30 min, FITC-streptavidin complex (Invitrogen; 1:400), and Draq5 counterstain (1:1,000; Biostatus) for 15 min. and detected under confocal microscopy (TCS-SP1, Leica).

Cell viability by MTT

$2 \times 10^4/\text{cm}^2$ HMEC-1, NXS2 or RAJI cells were plated in 24-wells, 12 h before incubation of the 3E2 or its isotypic mAb at various concentrations. After 24 h, 166 mg/ml of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide solution (Roche) were added for 4 h at 37°C . Color was revealed after overnight incubation at 37°C with 100 μl of 10% SDS in 0.01 M HCl and quantify at 570 nm on a Multiskan reader (Thermo Electron).

Western Blot

After lysis, 3E2-or IgM-treated HMEC-1 proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to ImmobilonP membrane (Millipore). The membrane was hybridized with anti-bodies of interest diluted at 1/1,000 for phospho-AKT (clone 9271; Cell Signaling), 1/1,000 for phospho-ERK (clone 9106; Cell Signaling), and 1/2,500 for actin (Santa Cruz).

Time-lapse assessment

$2 \times 10^4/\text{cm}^2$ HMEC-1 in 24-wells maintained at 37°C , 5% CO_2 were incubated with 3E2 or control at 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Digital images were taken every 10 min over 24 h under a time-lapse DMI6000B microscopy (Leica). Number of cells, mitosis index and cell detachment have been summed over the 24 h on 3 different $10 \times$ magnified microscopy shots per well.

Apoptotic assays

$2 \times 10^4/\text{cm}^2$ HMEC-1 were treated with either 3E2 or its IgM control 11E10 at 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 24 h before fixation and cell death analysis. Cell death was detected by morphology assay after Hoechst coloration or by flow cytometry analysis of the sub-G1 cell population after propidium iodide (PI) as described [28,29].

Aortic ring assay

8-week old male C₅₇BL/6 mice aortas were isolated as described [30]. Aorta rings were treated with either 3E2 or IgM control for 5 d. Then, pictures were shot at 100 \times magnification and a score based on the number, the length and the density of vessels, ranging 0 (no sprouting) to 5, was attributed by five independent panelists.

Metastatic and transplanted Murine tumor models

Six to eight week male A/J mice (Harlan) were studied following accordance with European Communities Council for the care of laboratory animals (86/609/EEC). Experimental hepatic metastases were induced by tail vein injection of 2.5×10^5 NXS2 on day 0 as described by Lode *et al.* [20]. Mice were treated with mAb *i.v.* injections on day 1, 2, 7 and 8 for 3E2 (200 μg in 150 μl PBS). Negative control mice received PBS only or control Ig. Positive control mice received anti-GD2 14G2a (100 μg in 100 μl PBS) on day 1 and 2. Animals were sacrificed on day 28, and the number of liver metastases was evaluated.

Established NXS2 tumors were induced by subcutaneous injection of 10^6 NXS2 cells in the right flank of A/J mice. When the tumor reached a volume of 100 mm^3 , mice were treated with mAb *i.v.* injections on day 0 and 3 for 3E2 (500 μg in 200 μl PBS). Negative control groups received control 11E10 IgM or PBS. Tumor size was measured every day with a digital caliper, and volume was calculated by applying the formula: volume (mm^3) = length \times width² \times 0.5. The end point of these studies was determined by both tumor size ($>2000 \text{ mm}^3$) and the condition and behavior of the animal. Morbidity is calculated when tumor reached the volume of 300 mm^3 .

Immunohistology

Frozen tumors or healthy organs sections of 5 μm were stained 90 min with rat anti-mouse CD31 (Millipore; 1:50) and biotinylated 3E2 or its isotypic control (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) by EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit (Thermo Scientific). Staining was revealed by 90 min of incubation with Alexa 488-conjugated goat anti-rat Ab (Invitrogen; 1:400) for CD31 and Alexa 568-conjugated streptavidin (Invitrogen; 1:200) for Gb3. Samples were counterstained with DAPI. Pictures were observed under an A1 confocal fluorescence microscope (Nikon). Colocalization between CD31 and Gb3 were processed by ImageJ with a median filter. Then, a threshold was applied to each channel of fluorescence. The binary resulting masks from the green and red channels were merged by the "colocalization" analysis processing, which shows only the common pixels to both channels.

Blood vessel density

Frozen tumor sections from the different treatments and time points were stained with anti-CD31 antibody and counterstained with 5 μM Draq5 as detailed above. The slides were examined using an Axiovert 200 microscope (Carl Zeiss) with a 20 \times apochromat. images were collected at an optical section thickness of 0.4 μm through the entire cell using the Apotome slider on the Axiovert 200. CD31 Fluorescence was quantified by ImageJ for

each condition. Mosaic images made of 24 fields (6 \times 4) were jointed to obtain a larger image.

Scatchard analysis

Scatchard binding assays were performed, as described [21] on iodine-125-labeled 3E2 with 10^6 cells. Cell-bound radioactivity was separately measured using a gamma-counter (Wallac). The binding data were analyzed according to a one-site equilibrium binding equation.

Statistic analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software for Student's t test, with 95% confidence estimations or 2 ways-ANOVA tests. Actuarial survival and morbidity was calculated by Kaplan-Meier product limit estimation and statistical significance in survival by the Mantel log-rank test.

Results

3E2 antibody targets Gb3

To generate mAbs against Gb3 with potent anti-angiogenic activity, we immunized Balb/c mice with proliferating primary microvascular endothelial HMVEC cells activated by T84 adenocarcinoma cells in a co-culture system (see Materials and Methods). After ELISA- and immunofluorescence-based screening, we established 6 hybridoma clones with reactivity to Gb3. 3E2 hybridoma clone with IgM isotype was selected for its strong binding properties to Gb3 (data not shown).

First, we show that 3E2, contrary to its isotypic control, binds on the cell membranes of proliferating HMEC-1 as shown by the green staining under confocal microscopy (Fig. 1A). By HPTLC, HMEC-1 is showing to express Gb3, such as RAJI (Fig. S1). We next demonstrated by FACS the exclusive binding of 3E2 to Gb3-expressing cell lines, HMEC-1 (3E2-positive cells: 68.2%; mean of fluorescence (MF): 568.3; Fig. 1B) and RAJI (3E2-positive cells: 87.9%; MF: 423.8), compared to the Gb3-negative cell line, NXS2 (2.9% of 3E2-positive cells; MF: 156.5). In the same conditions, control IgM do not bind to the Gb3-expressing cell lines (3E2-positive cells and MF for HMEC-1: 13%, 64.5; for RAJI: 3%, 82.5) confirming the 3E2 specificity. Finally, 3E2 binding activity against Gb3 was monitored by immunoTLC assay (Fig. 1C). Gangliosides mixture, neutral GSLs, pure Gb3 and HMEC-1 glycosphingolipids were loaded on silica TLC plate, then migrated in function of their hydrophobicity and molecular weight, as observed after orcinol staining (panel a). Hybridization with 3E2 showed the specific binding to a doublet on neutral GSLs, purified Gb3 and HMEC-1 lanes (panel b, lanes 2, 3 and 4), characterized as the Gb3 after orcinol staining (panel a, lane 3). No cross-reactivity of 3E2 is detected against lactosylceramide, glucosylceramide, GM3 or Gb4 as well with the remaining endothelial cells glycolipids (panel b, lanes 2 and 4). Gb3 specificity for the 3E2 was confirmed using another anti-Gb3 antibody the 38.13 mAb on HMEC-1, despite a potential discrepancy on the two bands affinity (panel c). Taken together with various immunological assays, our results demonstrated that 3E2 mAb specifically detect Gb3.

Gb3 is over-expressed in proliferating endothelial cells

We next analyzed the amount of Gb3 molecules at the cell surface of either proliferating or non-proliferating endothelial cells. As presented in Fig. 2A, lowering the serum concentration to 0.1% in the cell medium inhibits by 42.5% the proliferation of HMEC-1 cells measured by thymidine incorporation assay (26756 ± 2018 counts/min in 15% serum *vs.* 15379 ± 1893 in 0.1% serum;

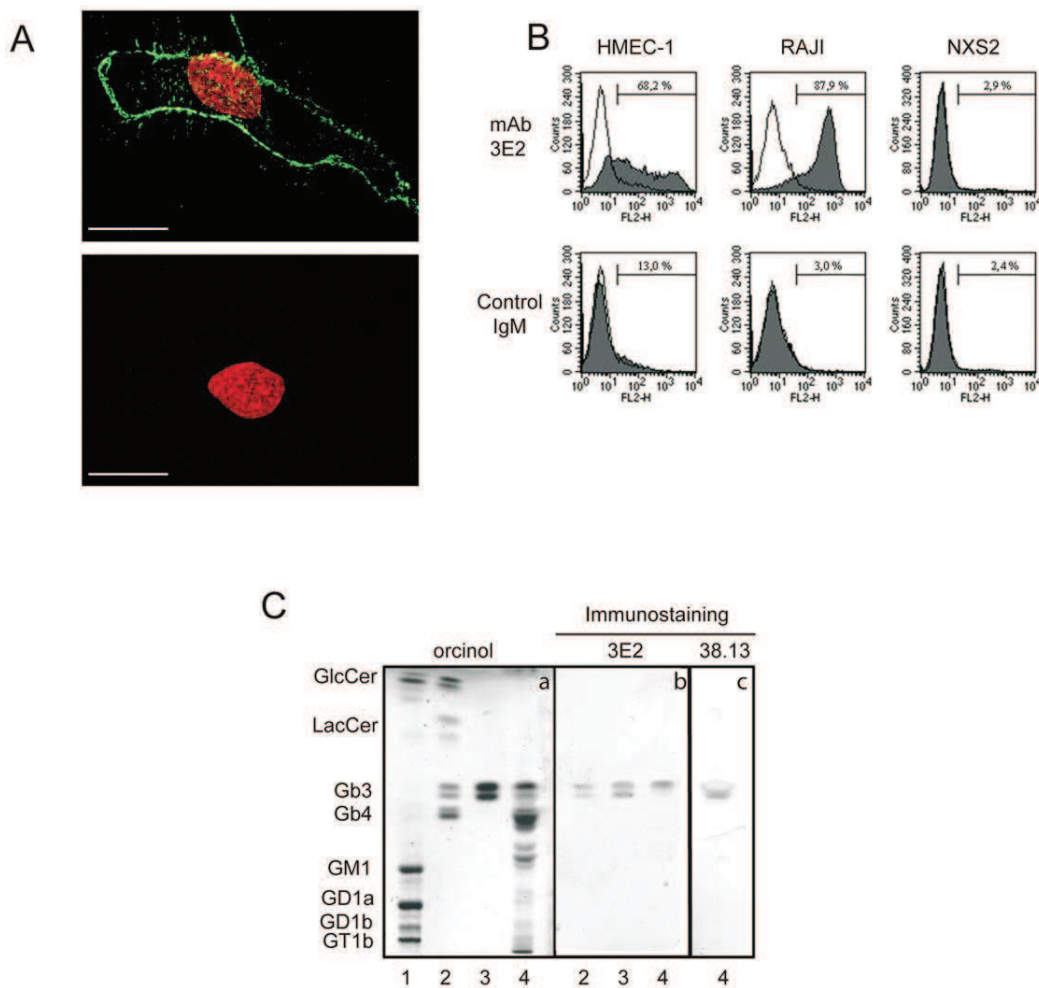


Figure 1. 3E2 targets Gb3 on the endothelial cell membrane. A) Gb3 immunolocalization in HMEC-1 by FITC-conjugated 3E2 (green; upper panel) vs. control isotypic 11E10 IgM (lower panel) and counterstaining with Draq5. Scale bar represent 20 μ m. B) Percentage of Gb3-positive cells by FACS analysis after hybridization of HMEC-1, RAJI and NXS2 cells with using 3E2 or isotypic control. C) GSLs profiles by orcinol staining after HPTLC (panel a) and Gb3 expression by immunohybridization using 3E2 (panel b) or commercially available 38.13 (panel c). Lane 1: rat brain gangliosides; lane 2: neutral GSLs mixture; lane 3, purified Gb3; lane 4: HMEC-1 glycolipids extract. doi:10.1371/journal.pone.0045423.g001

$p < 0.05$). On the other hand, adding 1 mM of pro-angiogenic S1P to low serum medium increase by 32% the cell proliferation (14941 ± 1719 counts/min in 0.1% serum+vehicle vs. 21959 ± 1719 in 0.1% serum+S1P; $p < 0.05$). Then, Gb3 synthase expression was evaluated by quantifying the mRNA level by RT-QPCR in function of the HMEC-1 proliferative status (figure 2B). We next quantify the Gb3 synthase mRNA level by RT-QPCR in function according to the HMEC-1 cells proliferative status (Fig. 2B). As expected, a high number of Gb3 synthase mRNA copies was detected in Raji cells, but not in T84 carcinoma cells. Interestingly, we found an 69% increase of Gb3 synthase mRNA copies in the proliferating HMEC-1 cells grown in the high serum medium compare to the same low dividing cells cultivated in the low serum medium ($p < 0.01$). Because Gb3 synthase allows the production of Gb3 from lactosyl-ceramide, Gb3 expression was quantified by optic density (OD) after HPTLC in function of the HMEC-1 proliferative status (figure 2C). OD of Gb3 bands in endothelial cells cultured in pro-proliferative conditions were higher as compared to the low proliferating one (OD 75% higher

in 15% serum vs. 0.1% serum; 47% higher in 0.1% serum+S1P vs. 0.1% serum). We confirmed the increase of Gb3 expression in proliferating endothelial cells by FACS (Fig. 2D). In fact, a larger number of Gb3 positive cells were stained by 3E2 in pro-proliferative as compared to pro-quietest experimental conditions ($66.4 \pm 6.1\%$ for 15% serum vs. $42.0 \pm 2.0\%$ for 0.1% serum; $42.1 \pm 10.3\%$ for 0.1% serum+S1P vs. $24.4 \pm 1.6\%$ for sham-control, $p < 0.05$). MF providing the relative quantities of Gb3 in HMEC-1 for the different experimental conditions, increase by 2 in cells cultured in full medium as compared to those in deprived medium ($639.6 \pm 18.9\%$ for 15% serum vs. $300.7 \pm 40.6\%$ for 0.1% serum, $p < 0.01$) and by 1.3 in S1P-treated cells as compared to its sham-control ($204.6 \pm 32.4\%$ for 0.1% serum+S1P vs. $159.7 \pm 2.5\%$ for sham-control, $p < 0.05$). Finally, the number of Gb3 molecules present at the cell surface was calculated by Scatchard analysis using I^{125} -labelled 3E2 (Fig. 2E). Fast proliferating HMEC-1 express 8.5 fold more Gb3 molecules in their cell membrane than low proliferating endothelial cells (Gb3 sites per cell: for 15% serum: 1.7×10^6 , Kd value: 30.2 nM; for

0.1% serum 0.2×10^6 , K_d value: 30.2 nM). Altogether our results confirm that G_b3 is over-expressed by proliferating endothelial cells. We next analyzed if mAb 3E2 binding would modulate G_b3 expression in proliferating HMEC-1 cells. First, we demonstrated that 3E2 antibody binding to proliferating HMEC-1 cells did not change their G_b3 synthase mRNA expression level after 24 hours treatment (vs. IgM-treated cells $p > 0.1$; Fig. 3A). In the same manner, cytometry analysis of G_b3 expression at the cell surface was not decreased by mAb 3E2 treatment (% of positive cells and means vs. control IgM-treated cells $p > 0.1$; Fig. 3B and C) proving a potential sequential use of anti-G_b3 3E2 antibody.

3E2 inhibits endothelial cell proliferation and *ex vivo* angiogenesis

To assess the anti-angiogenic properties of anti-G_b3 antibodies, we next measured the viability of HMEC-1 incubated with increasing doses of 3E2 for 24 h by MTT assay (Fig. 4A). 3E2, but not control IgM mAb, inhibits HMEC-1 viability in a dose dependant manner in the absence of complement to reach a maximum value of $18.3 \pm 0.8\%$ when cells are incubated with $60 \mu\text{g/ml}$ of anti-G_b3 mAb ($p < 0.01$ vs. IgM). Antibody 3E2 specific viability inhibitory effect was confirmed in the G_b3-expressing RAJI (data not shown), but not in G_b3-negative NXS2

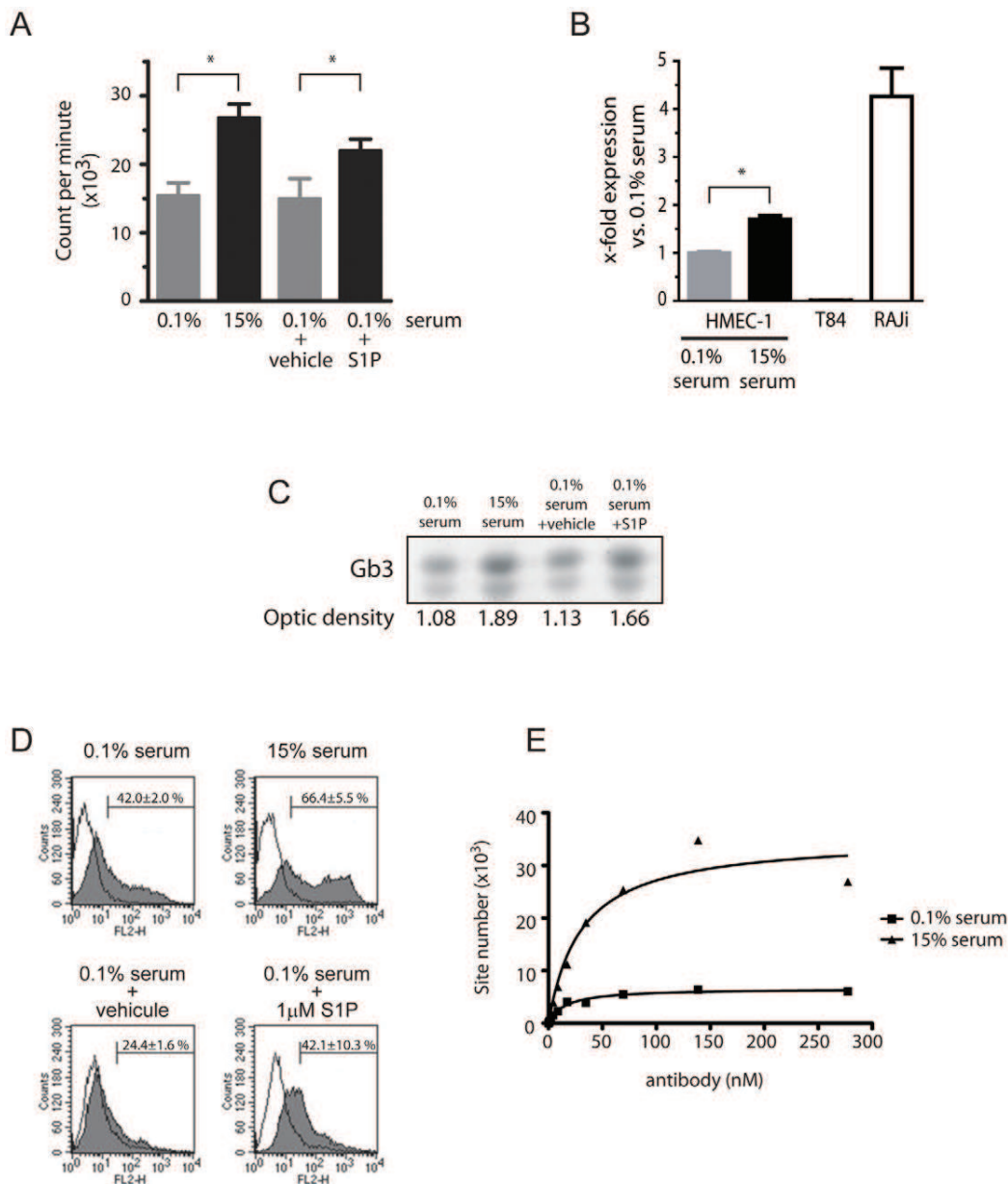


Figure 2. G_b3 is over-expressed in proliferating endothelial cells. HMEC-1 were treated with medium containing respectively 15% serum, 0.1% serum and 0.1% serum with 1 μM S1P or its vehicle. A) Proliferation assay by ^3H -thymidine incorporation 24 h after treatment. ($n = 3$; mean \pm SD; $*p \leq 0.05$). B) RT-Q PCR 24 h after treatment ($n = 6$; mean \pm SEM; ns: $p < 0.01$). C) G_b3 expression detected by 3E2 after immuno-HPLC. D) G_b3-positive HMEC-1 determined by FACS using 10 $\mu\text{g/ml}$ of 3E2 ($n = 3$). E). G_b3 site number determined by Scatchard analysis using 3E2. doi:10.1371/journal.pone.0045423.g002

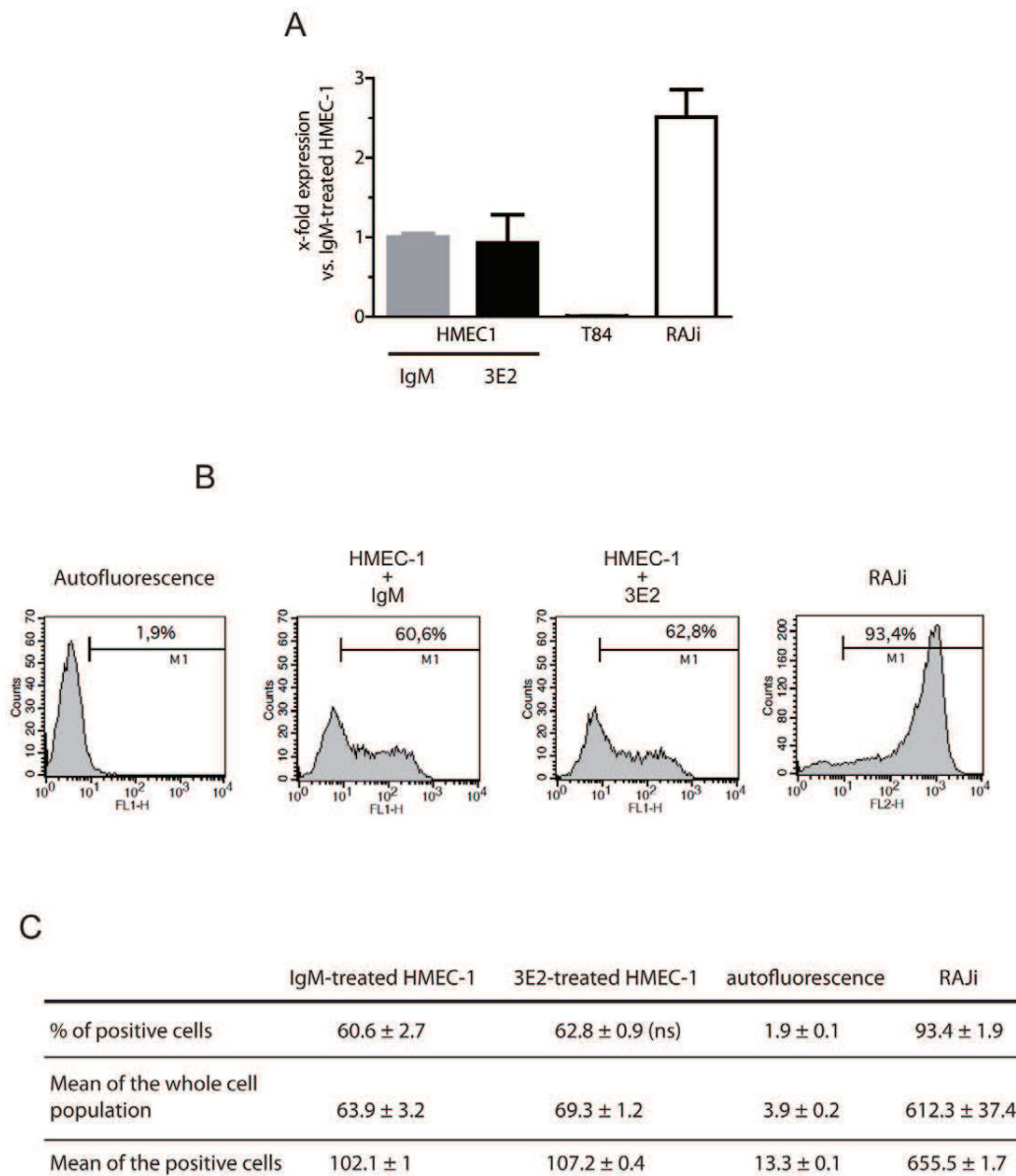


Figure 3. Gb3 is not modulated by 3E2 antibody treatment. HMEC-1 cells were treated with either 40 μ g/ml 3E2- or IgM control-antibody. A) RT-Q PCR 24 h after treatment ($n=6$; mean \pm SEM; ns: $p>0.1$). B) Gb3-positive HMEC-1 cells determined by FACS 24 h after treatment ($n=3$). C) Table analysis (% of positive cells, means) from Fig. 3 B (ns >0.1). doi:10.1371/journal.pone.0045423.g003

(Fig. 4A). We next studied the anti-proliferating function of mAb 3E2 by investigating its ability to modulate two of the ubiquitous molecular actors involved in angiogenesis and endothelial stress response [31]. In fact, protein analysis by western blot shows that activated forms of AKT and ERK were down regulated respectively 15 and 30 min after 3E2 antibody treatment (Fig. 4B). We further analyzed 3E2 anti-angiogenic properties in the *ex vivo* aorta ring assay (Fig. 4C and D). The sprouting formation of endothelial cells is clearly observed in aorta rings harvested from C₅₇Bl/6 mice and cultured for 5 d in decalcified medium. The sprouting formation is significantly reduced in 3E2-treated aortic rings in a dose dependent manner as shown by the decrease of the number of endothelial cell

branches on the pictures (Fig. 4C) and by the sprouting index estimated double blind observation from 5 different persons (Fig. 4D). The specificity of 3E2 anti-angiogenic properties was demonstrated since IgM treatment in the same dose range does not inhibit the sprouting of aorta rings. These results evidence that anti-Gb3 mAb inhibits *in vitro* and *ex vivo* angiogenesis.

To better understand the mechanisms by which 3E2 inhibits *ex vivo* angiogenesis, we tracked 3E2- or control IgM-treated HMEC-1 for 24 h by time-lapse microscopy. We first studied endothelial cell proliferation by counting the number of cells per photomicrography field in function of time (Fig. 5A and B). On the contrary to control IgM, 3E2 treatment alters the endothelial cell expansion over the 24 h after treatment (mean doubling time for

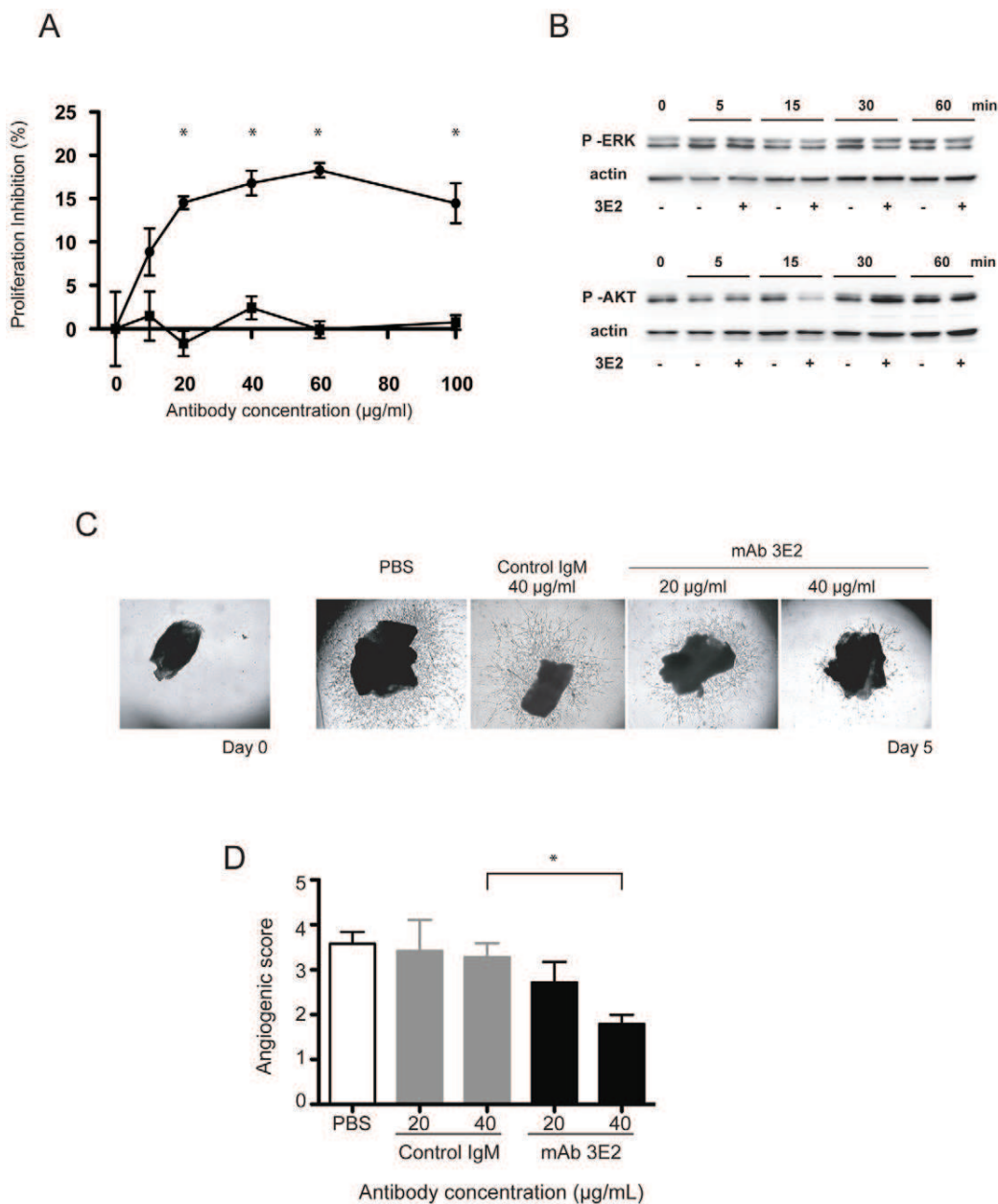


Figure 4. 3E2 antibody inhibits *ex vivo* angiogenesis. A) Viability measured by MTT of HMEC-1 treated for 24 h with increasing concentration of 3E2 (▼) or isotypic control (■) ($n=3$; mean \pm SEM; $*p<0.05$). B) Western blot of phosphor-ERK and phosphor-AKT from cells treated with either 40 μ g/ml 3E2 or IgM-control antibody ($n=3$). C) Photographs of sprouting vessels from aorta 5 d post-treatment by an increasing dose of 3E2 ($n=3$). D) Sprouting index from aorta rings 5 d post-treatment with 3E2 or isotypic control ($n=3$, mean \pm SEM; $*p<0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0045423.g004

IgM: 23.4 ± 1.5 h; for 3E2: 32.4 ± 3.5 h; $p<0.05$; Fig. 5A). Then, the number of cell divisions was identified in 4 time windows of 6 h over the 24 h of the study. The mitotic phase was detected by morphological changes occurring when a flat adherent cell separates into 2 daughter cells (Fig. S2). The number of cell division increased in function of time when cells were incubated with the isotopic control (figure 5C). Treatment with 3E2 strongly inhibited cell division during the first 18 hours (35.8% decrease of cell division vs. control in the time windows 12–18 h post-treatment). Later, the cell division seems to restart in the 3E2

group, which could be over-passed by a repetitive incubation of our anti-Gb3 antibody (data not shown). We next estimated mitosis duration in the presence of either anti-Gb3 mAb or IgM. Mitosis of the majority of the cells occurred in 40 to 80 min in the control cells (Fig. 5D). Antibody 3E2 treatment reduced significantly by 38% the number of cells per field dividing in 40–80 min (25.2 ± 2.3 in 3E2-treated cells vs. 40.6 ± 3.5 in the IgM-treated cells; $p<0.05$) and also prolonged by 55% the mitosis over 120 min (8.0 ± 1.3 cells in 3E2-treated sample vs. 3.6 ± 0.5 cells in the IgM-treated sample; $p<0.05$) and increased by 56% the

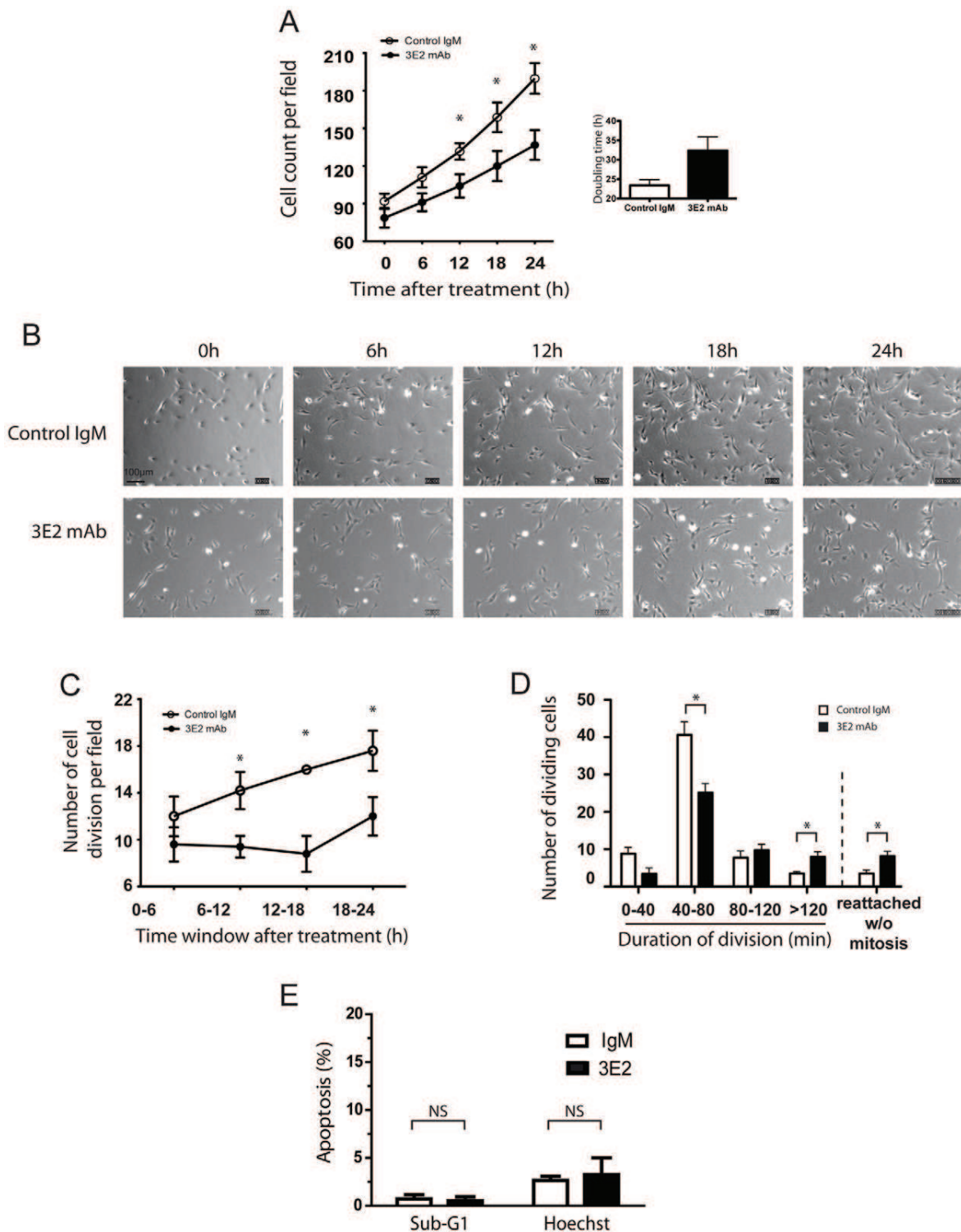


Figure 5. 3E2 antibody inhibits endothelial cell proliferation. HMEC-1 cells are tracked by videomicroscopy up to 24 h after treatment by 3E2 or isotypic control. A) Cell number per field in function of time. Histograms show the mean doubling time (n=6 for IgM and n=9 for 3E2, mean±SEM; *p<0.05). B) Microphotographs of representative fields of HMEC-1 in function of time. Magnification 10×. C) Number of mitosis summed every 6 h for 24 h (n=5, mean±SEM; *p<0.05). D) Duration of the mitosis (n=5, mean±SEM; *p<0.05). E) Cell death quantification detected by sub-G1 and hoechst assays from 3E2- or IgM-treated HMEC-1 (n=3; mean±SD; ns: p>0.1). doi:10.1371/journal.pone.0045423.g005

number of cells reattaching to the culture flask without mitosis (8.2 ± 1.2 in 3E2-treated cells vs. 3.6 ± 0.9 in IgM-treated cells; $p < 0.05$). No cell death was detected during the 24 hours of the time lapse studies. We confirmed the lack of cytotoxic effect of the 3E2 antibody was observed using either flow cytometry analysis of the sub-G₁ population by facs analysis or the percentage of the apoptotic morphology using Hoechst staining ($p > 0.1$ vs. IgM-treated cells for both analyse; Fig. 5E). Taken all together, our results suggest 3E2 inhibits endothelial cell expansion by disturbing mitosis and cell proliferation without increasing cell toxicity.

3E2 inhibits NXS2 metastases spreading

Because 3E2's role in inhibiting *in vitro* cell proliferation, we further investigated whether 3E2 specifically targets blood vessels within the tumor mass. We first developed 3E2 for an immunohistological approach (Fig. S3). After 3E2 hybridization, a strong brown DAB peroxidase staining was observed in G_b3-

positive RAJI tumor sections, but not in G_b3-negative IMR32 tumor sections. Because of its potential anti-angiogenic drug usable *in vivo*, we decide to determine the therapeutic efficacy of 3E2 in G_b3-negative metastases tumor model after injection of neuroblastoma NXS2 cells in the tail vein [20]. The validation of the G_b3 status of the tumor model and the tumor vessel were obtained by the staining for Alexa 568-conjugated 3E2 (red) and Alexa 488-conjugated CD31 (green) in NXS2 metastases frozen sections, which revealed a colocalization of G_b3 and endothelial marker as shown by the yellow staining on the merged image (Fig. 6A). To determine the anti-tumor efficacy of 3E2, the number of NXS2 liver metastases was counted 28 days after tumor cell injection. A positive responder cohort was established using mAb 14G2a directed against the neuroblastoma associated tumor antigen disialoganglioside GD2 (Fig. 6B and C). Both treatments were effective in reducing liver metastases, as indicated by a decrease of the number of liver metastases from 35 ± 6.3 in control mice to 17 ± 5.0 in 3E2-treated mice or 6.7 ± 2.1 in 14G2a-treated

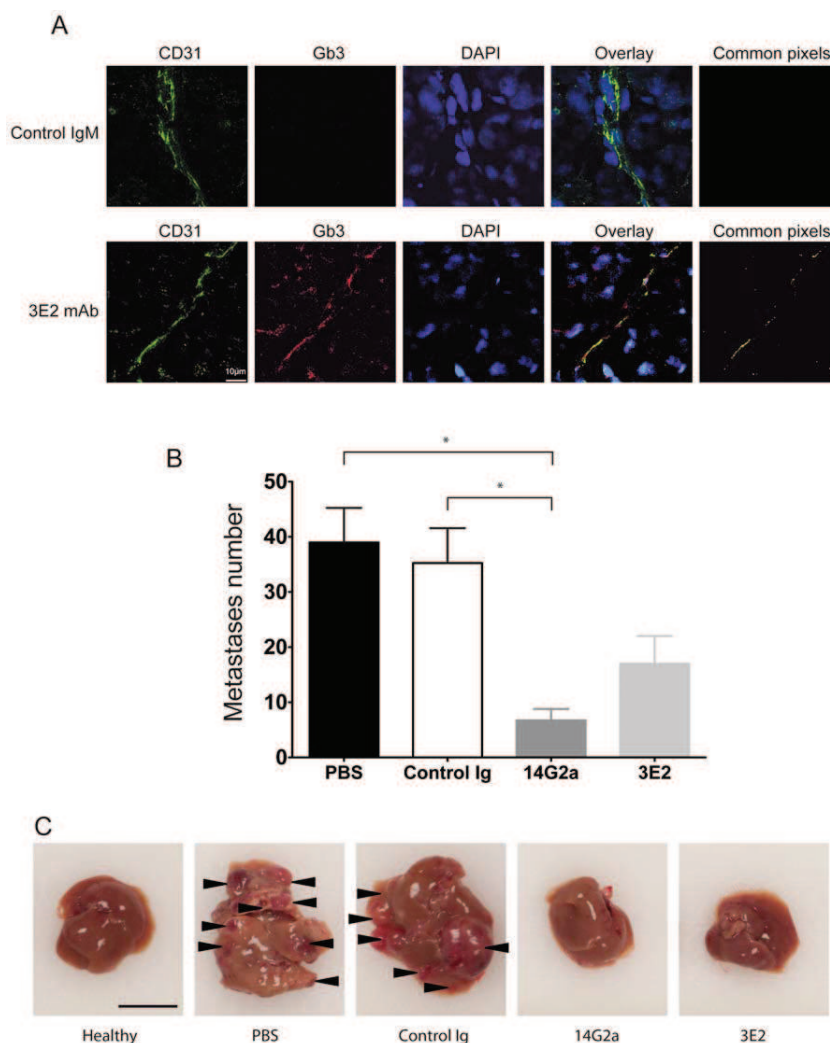


Figure 6. 3E2 inhibits *in vivo* metastases spreading. A) Pictures of NXS2 hepatic metastases by confocal microscopy stained with Alexa488-conjugated CD31 mAb (green), Alexa568-conjugated 3E2 (red) or isotypic IgM control and counterstained with Draq5. Colocalization of the endothelial marker CD31 and G_b3 is shown by the yellow staining on the merge image. B) Number of liver metastases per animal ($n = 6$; mean \pm SEM; $*p < 0.05$). C) Representative photograph of liver 28 days after NXS2 injection and the different immunotherapies (scale bar represents 1 cm). doi:10.1371/journal.pone.0045423.g006

Table 1. Distribution of Gb3 in organs from C57Bl/6 mouse obtained after staining with Alexa568-conjugated 3E2.

Tissue	Gb3	Isotypic control
Abdominal fat	–	–
Brain	–	–
Colon	–*	–*
Duodenum	–	–
Esophagus	–	–
Eyes	+	–
Heart	–	–
Kidney	+	–
Liver	#	#
Lung	–	–
Muscles	–	–
Ovaries	–	–
Pancreas	–	–
Pleura	–	–
Skin	+	–
Spleen	–	–
Stomach	–	–
Testis	+	–
Thyroid	–	–
Uterus	–	–

Frozen healthy organs sections of 5 μ m were hybridized with biotinylated 3E2 or its isotypic control, revealed by an Alexa 568-conjugated streptavidin and counterstained with DAPI. Pictures were observed under a confocal microscope (n = 3).

#: High background.

*: Lipofuscin autofluorescence.

doi:10.1371/journal.pone.0045423.t001

mice (both $p < 0.05$ vs. control). The number of metastases after 3E2 and 14G2a treatments was neither statistically different against each other nor against healthy control animals (both $p > 0.05$). Finally, the distribution of Gb3 in mouse healthy tissues was evaluated by immunohistology (Table 1). In summary, 3E2 binds only Gb3 present in kidney, skin, eye and testis. Most normal tissues did not express any detectable amount of Gb3. Because 3E2 is an IgM which distribution is limited to the intravascular compartment and because it recognizes blood vessels in solid tumor, but not vessels from healthy tissues, our results suggest that its therapeutics effect is likely to be restricted to these vessels.

3E2 mitigates the growth of NXS2 established tumors

Because anti-angiogenic drugs are also mitigating tumor development, we next evaluated the anti-tumor effects of anti-Gb3 mAb 3E2 in A/J mice with subcutaneous established NXS2 tumors. First, we measured daily the tumor volume after two injections of either 3E2- or IgM control- antibody (500 μ g) at day 0 and 3 in 100 mm^3 -established tumors. The anti-Gb3 mAb treatment strongly delayed the development of the fast growing NXS2 tumors ($p < 0.05$ between day 2 and 7 as compared to PBS- or IgM-treated tumors; Fig. 7A). In fact, the tumor growth was diminished by 3E2 treatment. The time for the tumors to reach 300 mm^3 was delayed in 3E2-treated group (median morbidity for 3E2 5 days vs. 3 for PBS and 4 for IgM; $p < 0.01$ Fig. 7B). This result was in correlation with a rise by two fold of the volume doubling time in the mice treated with anti-Gb3 antibody (mean

doubling for 3.2-treated tumors 3.92 days vs. 1.99 and 1.94 for respectively PBS- and IgM-treated tumors, $p < 0.01$; Fig. 7C). Finally, we measured the blood vessel density at day 1 and day 3. No difference in the blood vessel density was observed at day 1. On the other hand, a decrease of 70% of blood density was observed in tumors from the mice that had received mAb 3E2 compared to the IgM-control group ($p < 0.1$; Fig. 7D and E). Taken altogether, these data evidence an action of anti-Gb3 mAb 3E2 on the NXS2 tumor vasculature.

Discussion

Overall, our findings show that the mouse mAb IgM 3E2 specific for globotriaosylceramide Gb3, over-expressed in proliferating endothelial cells, displays anti-angiogenic properties, including *in vitro* modulation of the viability, inhibition of proliferating endothelial cells, *ex vivo* inhibition of endothelial cell sprouting in mouse aorta ring assay, and *in vivo* tumor growth suppression.

Although GSLs are able to modulate angiogenesis [32], the exact glycolipid composition of the human endothelial cells has generally received limited attention. Immunological detection of Gb3 using specific mAbs or verotoxins, in combination with anti-verotoxin antibodies, has demonstrated that Gb3 represent the dominant glycolipids among Gb4 in human umbilical endothelial cells (HUVECs) [33,34]. Gb3 and Gb4 are also the major glycolipid in primary and immortalized human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) [35]. In addition, previous observations suggest that inflammatory mediators, including $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ and LPS, up-regulate Gb3 level in the endothelial cells [36]. In this report, we further demonstrated that Gb3 concentration is increased in proliferating endothelial cells, in the presence of growth factors (complete medium) or pro-angiogenic factor S1P [37]. Our data suggest that endothelial cells require additional signals including pro-angiogenic molecules such as S1P to induce Gb3 synthesis. They also question whether Gb3 might play a role in the endothelial cell phenotypic changes during angiogenesis, as it was shown for its precursor LacCer in VEGF-induced angiogenesis [38]. Yet, our data, which are in agreement with others [39], point to Gb3 as an angiogenic marker for developing anti-angiogenic vectors. However, Gb3 is certainly not the only lock limiting step in angiogenesis and tumor development. The understanding of the connection between the different pro-angiogenic molecular pathways remains important to better define the adequate anti-angiogenic treatment using a single or a couple of concomitant drugs.

Because of the crucial issues regarding the immunogenicity of verotoxin-based vector, however, we sought to generate a mouse mAb specific for Gb3. We therefore immunized Balb/c mice with proliferating primary HMVEC cells activated by colic T84 adenocarcinoma cells, which are not expressing Gb3 (Fig. 2B and [40]) in a co-culture system. After screening on angiogenic endothelial cell membranes, 6 hybridoma clones were selected against Gb3. Antibody 3E2, an IgM-class mAb, was chosen for its strong binding properties. If the majority of therapeutic antibodies derived from IgG-class, IgM-class antibodies specific to glycolipid antigens offer unique advantages that make them highly desirable as cancer therapeutics. For example, IgM molecules are decavalent antibodies with high avidity for the target antigen. Their high valences also facilitate cell surface receptor cross-linking which in turn may lead to a more effective cell killing [41]. In patients with metastatic melanoma, GM3 ganglioside is more effectively targeted by IgMs than it is by IgGs, [42]. Furthermore, in the case of Gb3, a potential advantage of using an IgM-class

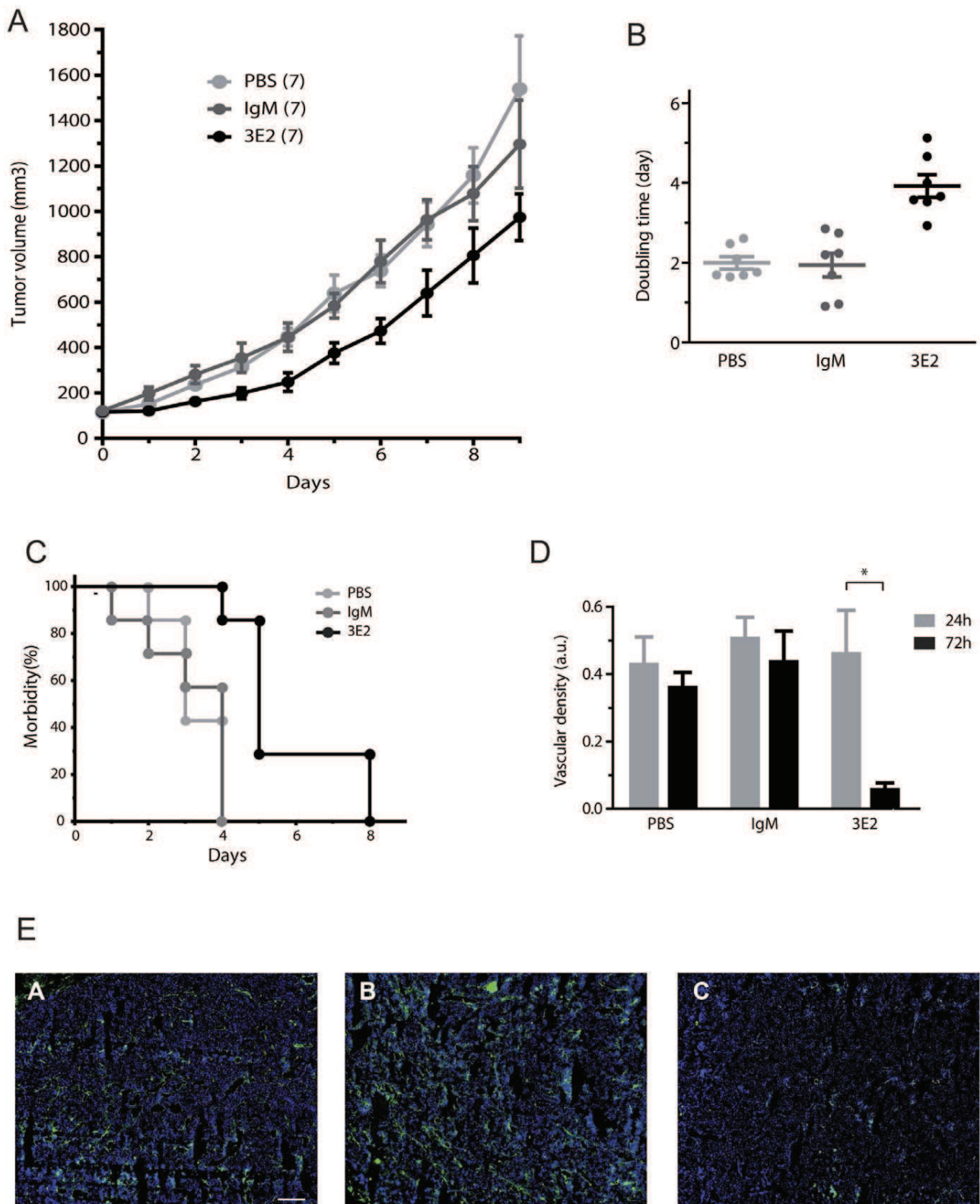


Figure 7. 3E2 mitigates tumor growth. A) Tumor volume of NXS2 tumors (n = 7; mean ± SEM; *p < 0.05). B) Doubling time of the each tumors (●) estimated during the four first days of the different treatments (bars: mean ± SEM; *p < 0.01; n = 7). C) Actuarial Morbidity curves of to tumor reaching 300 mm³ (n = 7). D) Vascular density estimated on 50 different slides on 3 different treated tumors (mean ± SEM; *p < 0.01; n = 3). E) Mosaic pictures by apotome microscopy stained with Alexa488-conjuguated CD31 mAb (green) and counterstained with Draq5 (bar: 500 μm). doi:10.1371/journal.pone.0045423.g007

antibody is that its tissue distribution is generally limited to the vascular compartment due to their large molecular weight. Thus, normal Gb3-expressing cells would not be negatively affected by hostile IgM antibodies.

For cancer immunotherapy, specificity of the antibody including binding affinity, CDC, ADCC, and signaling activity are critical. As for most of the IgM-class antibodies, 3E2 was efficient in inducing potent CDC-, but not ADCC-, activity against Gb3-expressing endothelial cells (Fig. S4) [43]. Interestingly, we also showed that 3E2 inhibits directly high Gb3-expressing cycling endothelial cell proliferation and subsequently angiogenesis offering a cytostatic property to our anti-Gb3 mAb. Moreover, Gb3 or Gb3 synthase expressions were not modified by mAb 3E2 treatment, which provides the opportunity to use sequentially our antibody for prolonged anti-tumor effect. Despite previous reports showing on B cells [44] or on Burkitt's lymphoma cells [45] an apoptosis induced by anti-Gb3 mAbs or shiga toxin B subunit, any increase of endothelial cell death was observed by time lapse or Hoechst staining or sub-G1 analysis after incubation of HMEC-1 with 40 µg/ml of 3E2 (Fig. 5E). However, apoptosis-like death driven by anti-Gb3 mAbs is not considered as a common feature of all Gb3-reacting mAbs [46] and might be dependent of the Gb3 species recognized by the antibody. In fact, fatty acid heterogeneity [47], hydroxylation [48], and/or chain length and unsaturation degree [49] may influence the lateral mobility of Gb3 in the plasma membrane, as well as the conformation of the trisaccharide head group presented at the cell surface. In the same manner, the structure of glycolipid ceramide moieties influences the binding activity of antibody [50]. Although the exact roles of the ceramide heterogeneity of Gb3 in antibody inhibitory signaling functions remain unclear, we hypothesize a functional role of certain Gb3 species that might provide a molecular basis for the different anti-Gb3 mAbs inhibitory effects.

Finally, we reported for the first time that passive immunotherapy with anti-Gb3 mAb 3E2 is effective in suppressing the growth of tumor and the spreading of metastases in murine syngeneic neuroblastoma models, which is relevant to the human disease [20]. Those models express GD2, a well-established tumor-associated neuroblastoma antigen [20], but not Gb3 as demonstrated here *in vitro* and *in vivo*. The distribution of Gb3 within the NXS2 metastases, evidenced by 3E2 overlay and validated via CD31 staining, is clearly limited to the blood vessel endothelial cells of the tumor compartment. These findings are consistent with previous observations of verotoxin binding to the neovasculature of frozen human neuroblastoma sections without any cross-reactivity with the tumor cells themselves [13,15,39,51], and demonstrate the relevance of our model. Yet, because Gb3 expression was limited to the tumor microvasculature, our result demonstrated that anti-vascular activity mediated by anti-Gb3 mAbs, is sufficient to inhibit blood vessels development (Fig. 7D and E), the growth of transplanted tumors (Fig. 7A) and the spreading of metastases (Fig. 6B). They also demonstrate that the anti-tumor efficacy of anti-Gb3 mAb 3E2 is comparable to that of anti-GD2 mAb 14G2a, which targets directly NXS2 neuroblastoma and has undergone clinical evaluation after positive results [52]. Interestingly, previous studies implicate angiogenesis as an essential mechanism regulating neuroblastoma growth [53] emphasizing the beneficial effect of mAbs specific for Gb3 in anti-angiogenesis treatment strategies in neuroblastoma.

Renal microvascular endothelium and kidney epithelia express Gb3 and might therefore be negatively affected by anti-Gb3 binding compounds [54]. In particular, the apoptotic effect of verotoxin may lead to severe side-effects due to the targeting of normal Gb3-expressing cells outside the tumor vasculature,

especially the microvasculature of the kidney [55]. Potential molecular targets for mAb-mediated anti-angiogenic immunotherapy should be expressed in a specific-tumor endothelial cell manner, unless the normal cells are not affected by antibody binding. As mentioned above, binding of 3E2 to Gb3 induces inhibitory signal potentially linked to AKT and ERK activation, in proliferating endothelial cells independently of immune effectors and apoptosis. Yet, the inhibitory effects of 3E2 to endothelial cell proliferation and angiogenesis independently of immune effectors recruitment and apoptosis, is particularly interesting because it may represent a novel strategy in limiting toxic verotoxin effects *in vivo*. In fact, no gross toxicity in mice was observed when 3E2 was injected. By Fc-engineering, it is possible to modulate the CDC activity of mAbs [56]. Therefore, the development of anti-Gb3 immunotherapeutic agents with decreased complement-dependent lyses may offer treatment options with reduced adverse side effects on the normal Gb3-expressing cells.

In conclusion, the mAb 3E2 induced inhibition of tumor-induced angiogenesis, coupled with the increased level of Gb3 found in the tumor cells and metastases indicate that anti-Gb3 treatment offers a promising alternative for verotoxin-based Gb3 ligands. Our observations further suggest the possibility for engineering new Gb3 specific vectors with limited toxicity to normal Gb3-expressing quiescent cells. Further investigations to determine and compare signaling pathways used by endothelial cells after Gb3 engagement by specific mAbs leading to anti-angiogenic activities are warranted.

Supporting Information

Figure S1 Glycolipids staining by orcinol after HPTLC shown a Gb3 expression in HMEC-1 and RAJI, but not in NXS2. Left panel lane 1: standard rat brain gangliosides, lane 2: standard neutral GSLs, lane 3: purified Gb3, lane 4: HMEC-1 glycolipids extract. Right panel glycolipids extract from: lane 1, HMEC-1; lane 2, RAJI; lane 3: NXS2.
(PDF)

Figure S2 Increased division time in 3E2-treated endothelial cells. Photographs of HMEC-1 cell division after IgM or 3E2 treatment using 20× magnification. Arrow heads show dividing cells.
(PDF)

Figure S3 Immunohistology of Gb3-positive tumors in Balb/c mice by 3E2. Gb3-positive RAJI tumor slices hybridized with 40 µg/ml 3E2, and then revealed by the brown staining of DAB-peroxidase (upper left). Control IgM (upper right) and Gb3-negative IMR32 tumors (lower right and left) showed no staining. Nuclei were counter-stained with hematoxylin (blue). Magnification 40×.
(PDF)

Figure S4 3E2 induces a complement dependent cytotoxicity in HMEC-1 and RAJI Gb3-positive cells, but not in NXS2 Gb3-negative cells. CDC was measured as the % of cell lysis induced by the 10 µg/ml of 3E2 with human serum for 2 h. Specific lysis was determined by FACS using propidium iodide (n = 3; mean ± SEM; *p < 0.05).
(PDF)

Acknowledgments

We thank N. Alvarez, S. Gouard and C. Niaudet for their technical help and J. Barbet and S. Ladish for constructive discussion.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MHG SB FP. Performed the experiments: AD TC DC MHG JF ND. Analyzed the data: AD TC PH SB

FP. Contributed reagents/materials/analysis tools: PH MHG. Wrote the paper: MHG JA SB FP.

References

- Folkman J (2007) Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 6: 273–286.
- Bergers G, Hanahan D (2008) Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8: 592–603.
- Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, et al. (2010) Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med* 363: 1324–1334.
- Sonnino S, Prinetti A, Mauri L, Chigorno V, Tettamanti G (2006) Dynamic and structural properties of sphingolipids as driving forces for the formation of membrane domains. *Chem Rev* 106: 2111–2125.
- Kannagi R, Fukuda MN, Hakomori S (1982) A new glycolipid antigen isolated from human erythrocyte membranes reacting with antibodies directed to globotriaosylceramide (globoside). *J Biol Chem* 257: 4438–4442.
- Mangency M, Richard Y, Coulaud D, Tursz T, Wiels J (1991) CD77: an antigen of germinal center B cells entering apoptosis. *Eur J Immunol* 21: 1131–1140.
- Paton JC, Paton AW (1998) Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 11: 450–479.
- Lingwood CA (1994) Verotoxin-binding in human renal sections. *Nephron* 66: 21–28.
- Nudelman E, Kannagi R, Hakomori S, Parsons M, Lipinski M, et al. (1983) A glycolipid antigen associated with Burkitt lymphoma defined by a monoclonal antibody. *Science* 220: 509–511.
- Korelitz BI, Sommers SC (1975) Responses to drug therapy in ulcerative colitis. Evaluation by rectal biopsy and histopathological changes. *Am J Gastroenterol* 64: 365–370.
- LaCasse EC, Bray MR, Patterson B, Lim WM, Perampalam S, et al. (1999) Shiga-like toxin-1 receptor on human breast cancer, lymphoma, and myeloma and absence from CD34(+) hematopoietic stem cells: implications for ex vivo tumor purging and autologous stem cell transplantation. *Blood* 94: 2901–2910.
- Distler U, Souady J, Hulsewig M, Drmic-Hofman I, Haier J, et al. (2009) Shiga toxin receptor Gb3Cer/CD77: tumor-association and promising therapeutic target in pancreas and colon cancer. *PLoS One* 4: e6813.
- Arab S, Russel E, Chapman WB, Rosen B, Lingwood CA (1997) Expression of the verotoxin receptor glycolipid, globotriaosylceramide, in ovarian hyperplasias. *Oncol Res* 9: 553–563.
- Ishitoya S, Kurazono H, Nishiyama H, Nakamura E, Kamoto T, et al. (2004) Verotoxin induces rapid elimination of human renal tumor xenografts in SCID mice. *J Urol* 171: 1309–1313.
- Lingwood CA (1999) Verotoxin/globotriaosyl ceramide recognition: angiopathy, angiogenesis and antineoplasia. *Biosci Rep* 19: 345–354.
- Johannes L, Romer W (2010) Shiga toxins—from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* 8: 105–116.
- Ludwig K, Karmali MA, Sarkin V, Bobrowski C, Petric M, et al. (2001) Antibody response to Shiga toxins Stx2 and Stx1 in children with enteropathic hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 39: 2272–2279.
- Reymond D, Johnson RP, Karmali MA, Petric M, Winkler M, et al. (1996) Neutralizing antibodies to *Escherichia coli* Vero cytotoxin 1 and antibodies to O157 lipopolysaccharide in healthy farm family members and urban residents. *J Clin Microbiol* 34: 2053–2057.
- Bonnaud S, Niaudet C, Pottier G, Gaugler MH, Millour J, et al. (2007) Sphingosine-1-phosphate protects proliferating endothelial cells from ceramide-induced apoptosis but not from DNA damage-induced mitotic death. *Cancer Res* 67: 1803–1811.
- Lode HN, Mochler T, Xiang R, Jonczyk A, Gillies SD, et al. (1999) Synergy between an antiangiogenic integrin alphav antagonist and an antibody-cytokine fusion protein eradicates spontaneous tumor metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1591–1596.
- Alvarez-Rueda N, Desselle A, Cochonneau D, Chaumette T, Clemenceau B, et al. (2011) A monoclonal antibody to O-acetyl-GD2 ganglioside and not to GD2 shows potent anti-tumor activity without peripheral nervous system cross-reactivity. *PLoS One* 6: e25220.
- Sugawara S, Kawano T, Omoto T, Hosono M, Tatsuta T, et al. (2009) Binding of Silurus asotus lectin to Gb3 on Raji cells causes disappearance of membrane-bound form of HSP70. *Biochim Biophys Acta* 1790: 101–109.
- Gaugler MH, Neunlist M, Bonnaud S, Aubert P, Benderitter M, et al. (2007) Intestinal epithelial cell dysfunction is mediated by an endothelial-specific radiation-induced bystander effect. *Radiat Res* 167: 185–193.
- Ladisch S, Li R (2000) Purification and analysis of gangliosides. *Methods Enzymol* 312: 135–145.
- Svennerholm L (1963) Chromatographic Separation of Human Brain Gangliosides. *J Neurochem* 10: 613–623.
- Yamaji T, Nishikawa K, Hanada K (2010) Transmembrane BAX inhibitor motif containing (TMBIM) family proteins perturbs a trans-Golgi network enzyme, Gb3 synthase, and reduces Gb3 biosynthesis. *J Biol Chem* 285: 35505–35518.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.
- Alvarez-Rueda N, Leprieux S, Clemenceau B, Supiot S, Sebille-Rivain V, et al. (2007) Binding activities and antitumor properties of a new mouse/human chimeric antibody specific for GD2 ganglioside antigen. *Clin Cancer Res* 13: 5613–5620.
- Oancea M, Mazumder S, Crosby ME, Almasan A (2006) Apoptosis assays. *Methods Mol Med* 129: 279–290.
- Clere N, Corre I, Faure S, Guihot AL, Vessieres E, et al. (2010) Deficiency or blockade of angiotensin II type 2 receptor delays tumorigenesis by inhibiting malignant cell proliferation and angiogenesis. *Int J Cancer* 127: 2279–2291.
- Zachary I (2003) VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans* 31: 1171–1177.
- Birkle S, Zeng G, Gao L, Yu RK, Aubry J (2003) Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie* 85: 455–463.
- Gillard BK, Jones MA, Marcus DM (1987) Glycosphingolipids of human umbilical vein endothelial cells and smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys* 256: 435–445.
- Muthing J, Duvar S, Heitmann D, Hanisch FG, Neumann U, et al. (1999) Isolation and structural characterization of glycosphingolipids of in vitro propagated human umbilical vein endothelial cells. *Glycobiology* 9: 459–468.
- Kanda T, Ariga T, Kubodera H, Jin HL, Owada K, et al. (2004) Glycosphingolipid composition of primary cultured human brain microvascular endothelial cells. *J Neurosci Res* 78: 141–150.
- Obrig TG, Del Vecchio PJ, Brown JE, Moran TP, Rowland BM, et al. (1988) Direct cytotoxic action of Shiga toxin on human vascular endothelial cells. *Infect Immun* 56: 2373–2378.
- Argraves KM, Wilkerson BA, Argraves WS, Fleming PA, Obeid LM, et al. (2004) Sphingosine-1-phosphate signaling promotes critical migratory events in vasculogenesis. *J Biol Chem* 279: 50580–50590.
- Kolmakova A, Rajesh M, Zang D, Pili R, Chatterjee S (2009) VEGF recruits lactosylceramide to induce endothelial cell adhesion molecule expression and angiogenesis in vitro and in vivo. *Glycoconj J* 26: 547–558.
- Heath-Engel HM, Lingwood CA (2003) Verotoxin sensitivity of ECV304 cells in vitro and in vivo in a xenograft tumour model: VT1 as a tumour neovascular marker. *Angiogenesis* 6: 129–141.
- Malyukova I, Murray KF, Zhu C, Boedeker E, Kane A, et al. (2009) Macropinocytosis in Shiga toxin 1 uptake by human intestinal epithelial cells and transcellular transcytosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296: G78–92.
- Vollmers HP, Brandlein S (2005) Death by stress: natural IgM-induced apoptosis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 27: 185–191.
- Irie RF, Ollila DW, O'Day S, Morton DL (2004) Phase I pilot clinical trial of human IgM monoclonal antibody to ganglioside GM3 in patients with metastatic melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 53: 110–117.
- Rumpold H, Wiedermann G, Scheiner O, Kraft D, Stemberger H (1981) Lack of evidence for IgM-induced ADCC: studies with monoclonal and polyclonal antibodies. *Immunology* 43: 161–170.
- Marcato P, Mulvey G, Armstrong GD (2002) Cloned Shiga toxin 2 B subunit induces apoptosis in Ramos Burkitt's lymphoma B cells. *Infect Immun* 70: 1279–1286.
- Tetaud C, Falguieres T, Carlier K, Lecluse Y, Garibal J, et al. (2003) Two distinct Gb3/CD77 signaling pathways leading to apoptosis are triggered by anti-Gb3/CD77 mAb and verotoxin-1. *J Biol Chem* 278: 45200–45208.
- Kondo Y, Tokuda N, Furukawa K, Ando R, Uchikawa M, et al. (2011) Efficient generation of useful monoclonal antibodies reactive with globotriaosylceramide using knockout mice lacking Gb3/CD77 synthase. *Glycoconj J* 28: 371–384.
- Pellizzari A, Pang H, Lingwood CA (1992) Binding of verocytotoxin 1 to its receptor is influenced by differences in receptor fatty acid content. *Biochemistry* 31: 1363–1370.
- Binnington B, Lingwood D, Nutikka A, Lingwood CA (2002) Effect of globotriaosyl ceramide fatty acid alpha-hydroxylation on the binding by verotoxin 1 and verotoxin 2. *Neurochem Res* 27: 807–813.
- Kiarash A, Boyd B, Lingwood CA (1994) Glycosphingolipid receptor function is modified by fatty acid content. Verotoxin 1 and verotoxin 2c preferentially recognize different globotriaosyl ceramide fatty acid homologues. *J Biol Chem* 269: 11138–11146.
- Tagawa Y, Laroy W, Nimrichter L, Fromholt SE, Moser AB, et al. (2002) Anti-ganglioside antibodies bind with enhanced affinity to gangliosides containing very long chain fatty acids. *Neurochem Res* 27: 847–855.
- Viel T, Dransart E, Nemati F, Henry E, Theze B, et al. (2008) In vivo tumor targeting by the B-subunit of shiga toxin. *Mol Imaging* 7: 239–247.
- Murray JL, Cunningham JE, Brewer H, Mujoo K, Zukowski AA, et al. (1994) Phase I trial of murine monoclonal antibody 14G2a administered by prolonged intravenous infusion in patients with neurocutaneous tumors. *J Clin Oncol* 12: 184–193.

53. Chlenski A, Liu S, Cohn SL (2003) The regulation of angiogenesis in neuroblastoma. *Cancer Lett* 197: 47–52.
54. Kaye SA, Louise CB, Boyd B, Lingwood CA, Obrig TG (1993) Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: interleukin-1 beta enhancement of Shiga toxin cytotoxicity toward human vascular endothelial cells in vitro. *Infect Immun* 61: 3886–3891.
55. Murray LJ, Habeshaw JA, Wiels J, Greaves MF (1985) Expression of Burkitt lymphoma-associated antigen (defined by the monoclonal antibody 38.13) on both normal and malignant germinal-centre B cells. *Int J Cancer* 36: 561–565.
56. Sorkin LS, Otto M, Baldwin WM, 3rd, Vail E, Gillies SD, et al. (2010) Anti-GD(2) with an FC point mutation reduces complement fixation and decreases antibody-induced allodynia. *Pain* 149: 135–142.

Inhibition of tumor angiogenesis by globotriaosyl ceramide Gb3 immunotargeting

Stéphane Birklé^{1,2,3}, Ariane Desselle^{1,2,3,†}, Tanguy Chaumette^{1,2,3,†}, Marie-Hélène Gaugler^{1,2,3,4}, Denis Cochonneau^{1,2,3}, Julien Fleurence^{1,2,3}, Nolwenn Dubois^{1,2,3,6}, Philippe Hulin⁵, Jacques Aubry^{1,2,3}, and François Paris^{1,2,3,6}

¹Inserm, UMR892, Nantes, F-44000, France.

²Université de Nantes, Nantes, F-44000, France.

³CNRS, UMR 6299, Nantes, F-44000, France.

⁴Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Fontenay-aux-Roses, F-92260, France.

⁵Inserm, SFR Santé UMS 016, Nantes, F-44000 France.

⁶Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain, F-44800, France.

† Contributed equally to the manuscript

Address correspondence to: François Paris, INSERM UMR892 - Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Institut de Recherche en Santé, Université de Nantes, 8 quai Moncoussu, 44007 Nantes, Cedex 1, France. Phone: +33 (0)2.40.28.08.03.02; Fax: +33 (0)2.28.08.02.04; e-mail: francois.paris@inserm.fr

Key words: Gb3/antibody/Glycosphingolipid/Anti-angiogenic therapy

Abstract

The anti-angiogenic immunostrategies are mainly focused on the blockade of circulating cytokines or proteins over-expressed in endothelial cell membrane. We proposed globotriaosylceramide Gb3 as a viable alternative target to angiogenesis. After developing an anti-Gb3 antibody, its therapeutic efficacy has been validated through the inhibition of tumor growth and metastases spreading.

Commentary

The dependence of tumor growth on blood vessels makes tumor angiogenesis a rational target for cancer therapy. Several anti-angiogenic drugs are currently used in patients that target mainly endothelial cell growth factors or their receptors. Compensatory mechanisms limit however the clinical benefits of these compounds. Thus, the discovery of novel pro-angiogenic factors remains essential to design more efficient anti-angiogenic therapy. Recent works demonstrate that the immunological or pharmacological blockages of secreted bioactive lipids, such as sphingosine-1-phosphate (S1P) or lysophosphatidic acid (LPA), inhibit tumor angiogenesis [1]. In addition, tumor-associated glycosphingolipids (GSLs) complex lipids composed of a backbone hydrophobic ceramide membrane anchor and a hydrophilic cell surface-exposed oligosaccharide chain have recently been proven to be effective as adjunct cancer therapy targets [2]. We hypothesized that some GSLs species may over-expressed in proliferating endothelial, making them new targets for anti-angiogenic therapy [3].

To develop monoclonal antibodies (mAbs) directed against GSLs over-expressed in angiogenic endothelial cells, Balb/c mice have been immunized with proliferating primary HMVEC endothelial cells activated by colic T84 adenocarcinoma cells. After somatic hybridation, 13 over 1086 hybridomas were selected by ELISA and FACS analysis to bind cytoplasmic membrane from proliferating endothelial cells. If 7 of the mAbs were characterized against glycoproteins, the others 6 were against the same glycolipid, the neutral GSL Gb3 (figure 1) also called CD77. All hybridoma selected were IgM-class mAbs. If the majority of therapeutic antibodies derived from IgG-class, IgM-class antibodies specific are decavalent with high avidity for the target antigen offering unique advantages for cancer therapeutics. Furthermore, IgM-class antibody is mainly limited to the vascular compartment

due to their large molecular weight, representing a potential advantage for immunotherapy strategy.

After selecting and 3E2 mAb for its high affinity, we confirmed by immuno-TLC, FACS and Scatchard analyses that Gb3 concentration on the plasma membrane is enhanced in proliferating endothelial cells, as compared to non-proliferating endothelial cells. The over-expression of Gb3 glycolipid in angiogenic endothelial cells is related to an enhancement of the transcriptional activity of the Gb3 synthase gene quantified by RT-QPCR. We confirmed these data *in vivo* where we found that tumor blood vessels were strongly stained by mAb 3E2 specific for Gb3, but not normal tissues. *In vivo* investigation by SPECT-CT would provide the needed validation to propose Gb3 as a tumoral angiogenic marker. We focused, however, our attention on the therapeutic properties of anti-Gb3 mAb 3E2 Gb3. Immunotargeting Gb3 to limit angiogenesis has been already proposed using verotoxins [4] which bind to at least three Gb3 molecules before to be internalized. Internalization of verotoxin further leads to endothelial cell apoptosis. Because of the crucial issues regarding the immunogenicity and *in vivo* distribution properties of verotoxin-based vectors, we sought mAb could represent a better alternative to block tumor angiogenesis.

We found that antibody 3E2 treatment of proliferating endothelial cells maintained *in vitro* induces a down-regulation of AKT and ERK stress signaling pathways in correlation with an enhancement of the duration of the mitosis and a decrease of cell proliferation. Our data were reproduced *ex vivo* where mAb 3E2 treatment inhibited the spreading of endothelial cells from the aorta rings cultured with growth factors. Globotriaosyl ceramide Gb3 is, however, certainly not the only lock-limiting step in angiogenesis and tumor development. VEGF-induced angiogenesis is dependent of lactosylceramide, the Gb3 substrate [5]. The understanding of the connection between the different pro-angiogenic molecular pathways remains important to better define the adequate anti-angiogenic treatment using a single or a

couple of concomitant drugs. On the contrary to verotoxin and others anti-Gb3 mAbs, we did not see any increase of endothelial cell death after 3E2 mAb treatment using time lapse microscopy, Hoechst staining, and sub-G1 analysis. Fatty acid, hydroxylation, chain length, and unsaturation degree heterogeneities may influence Gb3 lateral motility and Gb3 trisaccharide head orientation, thereby modulating the binding activity and internalization properties of hostile ligands and may explain the unique properties of mAb 3E2. Further investigations are necessary to characterize mAb epitope and the discrepancy of the cell signaling pathways induced by 3E2 mAb and the verotoxins.

Gb3 expression was not down regulated after mAb 3E2 treatment. This provides the opportunity to use sequentially our antibody to prolong anti-tumor effect. To avoid a direct tumor cell response and work on the anti-vascular activity mediated by the 3E2 mAb, we focused our studies on the NXS2 murine neuroblastoma syngenic in A/J mice in which Gb3 expression was limited to the tumor microvasculature. Two models were available. NXS2 cells injected subcutaneously growth as primary tumor while injected intravenously spread as hepatic metastases. Antibody 3E2 was effective in limiting blood vessel development and reducing vessel density, thus impacting on tumor growth and metastases formation. The apoptotic effect of verotoxin may lead to severe side-effects due to the targeting of normal Gb3-expressing cells outside the tumor vasculature, especially the microvasculature of the kidney. Yet, 3E2 mAb affects endothelial cell proliferation, but not the immune effectors recruitment and apoptosis, which represent a novel anti-Gb3 strategy on tumor. Gb3 is also over-expressed by tumor from different origins such as breast-, prostate-, and colon-carcinomas. Antibody 3E2 immunotherapy against Gb3-expressing tumors should target and inhibit both endothelial- and tumor-cell proliferation, leading to stronger tumor growth control and/or regression.

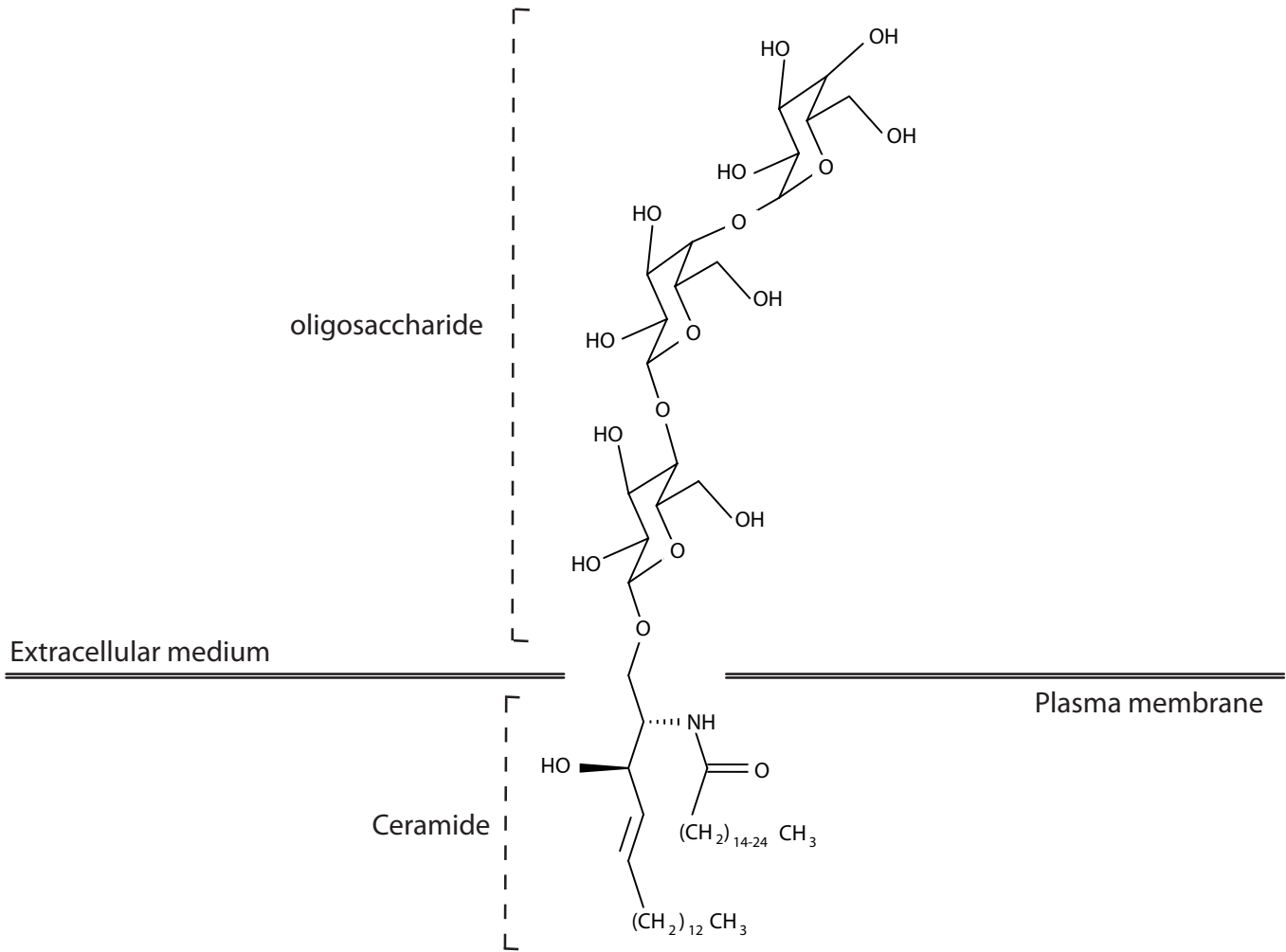
In conclusion, Gb3-targeting by mAb 3E2 inhibits tumor-induced angiogenesis and limits tumor growth and metastases formation. A better characterization of the molecular events induced by 3E2 mAb will help to understand its potential therapeutic application alone and combined with other anti-tumor treatments.

Figure 1: Structure of globotriaosyl ceramide Gb3

References

1. Peyruchaud O (2009) Novel implications for lysophospholipids, lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate, as drug targets in cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 9: 381-391.
2. Sonnino S, Prinetti A, Mauri L, Chigorno V, Tettamanti G (2006) Dynamic and structural properties of sphingolipids as driving forces for the formation of membrane domains. *Chem Rev* 106: 2111-2125.
3. Desselle A, Chaumette T, Gaugler MH, Cochonneau D, Fleurence J, et al. (2012) Anti-gb3 monoclonal antibody inhibits angiogenesis and tumor development. *PLoS One* 7: e45423.
4. Paton JC, Paton AW (1998) Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 11: 450-479.
5. Rajesh M, Kolmakova A, Chatterjee S (2005) Novel role of lactosylceramide in vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis in human endothelial cells. *Circ Res* 97: 796-804.

Figure 1



Vu, le Président de jury,

Vu, le Directeur de thèse,

Vu, le Directeur de l'UFR,

Nom-Prénoms : FLEURENCE Julien, Jacques, Serge

Titre de la thèse : Le neuroblastome : Innovations diagnostiques et thérapeutiques

Résumé de la thèse : Le neuroblastome représente 8 à 10 % des tumeurs pédiatriques et est la tumeur solide la plus fréquente chez l'enfant de moins de 5 ans. Il s'agit d'un cancer du système nerveux sympathique qui dans plus de la moitié des cas est diagnostiqué au stade métastatique. Le pronostic des patients atteints d'un neuroblastome de haut grade reste très péjoratif avec un taux de survie à 5 ans égal à 40 %. La recherche de nouveaux marqueurs plus spécifiques et plus sensibles ainsi que le développement de nouvelles thérapies apparaît donc nécessaire pour ces patients. De nouvelles approches thérapeutiques se développent notamment avec l'immunothérapie et la thérapie anti-angiogénique. Récemment le rôle des glycosphingolipides dans les processus tumoraux a été décrit. Les glycosphingolipides sont des molécules très conservées entre les espèces facilitant le transfert des études précliniques chez l'animal aux études cliniques chez l'homme. Le globotriaosyl céramide est surexprimé dans de nombreuses lignées tumorales mais également à la surface des cellules endothéliales intratumorales impliquées dans l'angiogénèse tumorale. Un anticorps monoclonal, le 3E2, ciblant spécifiquement le Gb3 a été obtenu et ses caractéristiques sont actuellement étudiées dans le but de caractériser ses propriétés anti-angiogéniques.

JURY

PRÉSIDENT : Mr Yves-François Pouchus, Professeur de Mycologie et de Botanique
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

ASSESEURS : Mr Stéphane Birklé, Maître de conférences en Immunologie

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

Mme Françoise Nazih, Maître de conférences en Biochimie

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

Mme Estelle Thébaud, Docteur en hématologie-oncologie pédiatrique

Centre Hospitalo-Universitaire Hôtel-Dieu de Nantes

Adresse de l'auteur : Route de la corde, 44119 Grandchamp-des-Fontaines