



**HAL**  
open science

# Neuroblastome, résistance in vivo à l'irinotecan et voie de signalisation ALK

Munier Munier Bousseton

## ► To cite this version:

Munier Munier Bousseton. Neuroblastome, résistance in vivo à l'irinotecan et voie de signalisation ALK. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T025 . tel-00829102

**HAL Id: tel-00829102**

**<https://theses.hal.science/tel-00829102>**

Submitted on 2 Jun 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE PARIS XI**  
**FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD**

**Année 2012**

**THESE**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI**  
Spécialité : Pharmacologie et Biologie Cellulaires et Moléculaires  
Ecole Doctorale de Cancérologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Fabienne Munier-Bousseton**

Le 07 juin 2012

**NEUROBLASTOME, RESISTANCE *IN VIVO* A L'IRINOTECAN  
ET VOIE DE SIGNALISATION ALK**

**JURY :**

Dr. Isabelle Janoueix-Lerosey (Rapporteur)

Dr. Philippe Pourquier (Rapporteur)

Dr. Marc Vigny (Examineur)

Dr. Filippo Rosselli (Président)

Pr. Gilles Vassal (Directeur)

# REMERCIEMENTS

Mes remerciements se dirigeront tout d'abord vers les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Je suis ravie que les Docteurs Isabelle Janoueix-Lerosey et Philippe Pourquier aient accepté le rôle de rapporteur. J'ai eu la chance de recevoir des conseils précieux de leurs parts à différentes reprises. J'ai également pu avoir des échanges scientifiques très intéressants avec chacun d'entre eux durant des congrès ou même une semaine de manipulation à Bordeaux dans le laboratoire de Philippe Pourquier. Merci également au Docteur Filippo Rosselli qui a eu la gentillesse de me donner des conseils très utiles sur le projet.

Enfin, je souhaite remercier chaleureusement le Professeur Gilles Vassal, mon directeur de thèse pour sa confiance et son soutien durant mes années de thèse. Il a initié ce projet de recherche très intéressant il y a plus de 10 ans et a su le guider pour l'orienter continuellement vers des perspectives cliniques. Je le remercie de m'avoir fait confiance et d'avoir su toujours me poser les questions utiles pour faire avancer le projet.

Au sein des deux laboratoires successifs dans lesquels j'ai travaillé, j'ai été encadrée de près ou de loin par des personnes passionnées et rigoureuses, deux qualités qui sont à mes yeux essentielles pour un chercheur. Jacques Grill a toujours pris le temps de me donner de très nombreuses idées de manip et a su avoir un œil critique sur mes données. Angelo Paci et Jérôme Bouligand m'ont donné beaucoup de conseils et inculqué de bonnes habitudes pour mes débuts dans la recherche au cours de mon Master 2 et m'ont surtout donné envie de continuer dans cette voie. Lluís Mir est un directeur de laboratoire très humain qui est toujours disponible et sait apporter des remarques très constructives sur les projets, aussi variés soient-ils. Enfin je remercie Birgit Georger qui dirige et suit de près l'équipe «Recherche de nouvelles cibles thérapeutiques dans les cancers pédiatriques» avec dynamisme, enthousiasme et un regard de clinicien toujours tourné vers les patients.

J'ai aussi eu l'opportunité de pouvoir encadrer des étudiants, Quentin, Ewa, Laura et Marion. Ce fut une expérience très enrichissante pour moi et je les remercie tous pour le travail qu'ils ont fourni, leur motivation et leur gentillesse. Merci à Ewa pour m'avoir fait progresser en anglais.

J'ai également eu la chance de travailler avec de nombreuses personnes de toutes compétences toutes nationalités et tous âges; ce fut une expérience très enrichissante

scientifiquement et humainement. Je pense notamment à Ludivine (merci d'avoir entretenu la xéno IGR-NB8-R), Véro, Hania, Céline R., Geoffrey, Cathy, Carmela, Pascale, Samar, Atmane, Lionel, Alain, Bastien, Thomas, Cedric, Marion, Catherine, Mirile, Léa, Anne-Laure, Anna, Christian, Najat, Elodie, Gaëtan, toutes les Marie de l'UMR, Ysabel, Isabelle, Karim, Liliane, Anastazia, Aude, Christophe, Frank, Quentin, Giorgia, Afiz, Yann L., Olivia, Benoît, Aurélie, Mélanie, Aïsha, Romain, Nathalie, Céline F., Emilie, Karine, Valérie, Peggy, Nathalie, Yann M., Pierre, Evelyne, Aurore, Matthieu, Aurore, Nicolas et Virginie.

Je remercie très chaleureusement Marie qui menait ce projet de recherche avant moi. Nous avons travaillé une année ensemble et elle m'a appris beaucoup de choses sur le plan technique et scientifique. Au cours de nos manipulations et de nos discussions nous avons appris à nous connaître et à nous apprécier. Je remercie également les deux doctorants qui ont travaillé avant nous sur ce projet, Alexandre et Loreley.

Je souhaite remercier sincèrement Felipe. Je garde un très bon souvenir des moments où nous partageons le(s) même(s) bureau(x) et je suis contente d'avoir vécu les moments un peu stressants de la fin de thèse avec toi.

Un merci tout particulier à Estelle, qui était présente au laboratoire du premier au dernier jour de ma thèse. J'ai eu la chance qu'elle me forme à l'expérimentation animale, j'en garde un excellent souvenir. Sa motivation, son sens de l'entraide et sa gentillesse m'ont particulièrement marquée. J'espère que notre amitié durera au-delà de la thèse.

Un grand grand merci à Karine B., une personne formidable sur le plan humain et professionnel. J'espère que nous réussirons à garder contact.

J'ai également une pensée de soutien pour tous les enfants du service de pédiatrie de l'IGR ainsi que pour leurs parents.

Le dernier merci et certainement le plus difficile à exprimer sera bien sûr pour ma famille et mes amis, qui m'entourent au quotidien (ou presque). Votre présence est un soutien énorme et indispensable. Merci tout spécial à Aurélien pour ton aide informatique MAIS SURTOUT POUR TOUT LE RESTE.

<b>PREAMBULE .....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>8</b>
<b>Partie . 1 LE NEUROBLASTOME .....</b>	<b>8</b>
I. Initiation du neuroblastome.....	8
II. Etiologie.....	12
III. Incidence .....	14
IV. Présentation clinique .....	15
V. Diagnostic .....	17
VI. Facteurs pronostiques.....	18
1. Stade d’extension de la maladie et facteurs de risque associés à la chirurgie .....	19
2. Age du patient au diagnostic .....	20
3. Données anatomo-pathologiques.....	20
4. Caractéristiques génétiques .....	23
a. Amplification de l’oncogène N-myc.....	23
b. Délétion de la région 11q .....	23
c. Contenu en ADN, ploïdie des cellules .....	24
VII. Traitements.....	25
VIII. Limiter les rechutes et comprendre les mécanismes potentiels de résistance .....	27
1. Les traitements de maintenance pour limiter les rechutes.....	27
2. Comprendre les mécanismes potentiels de résistance .....	28
IX. Autres classifications et nouvelles cibles thérapeutiques .....	30
1. De nouveaux outils pour identifier de nouveaux marqueurs.....	30
2. Les nouvelles cibles thérapeutiques et thérapies innovantes.....	33
3. Emergence de ALK comme cible thérapeutique du neuroblastome .....	37
<b>Partie . 2 LES INHIBITEURS DE TOPOISOMÉRIASE I.....</b>	<b>44</b>
I. Les ADN topoisomérase.....	44
1. L’ADN topoisomérase I .....	46
a. Structure .....	46
b. Mécanisme d’action, interaction avec l’ADN.....	48
c. Fonctions de la topoisomérase 1 .....	50
2. La topoisomérase I comme cible thérapeutique .....	50
II. Les inhibiteurs de topoisomérase I.....	51
1. Les différentes classes d’inhibiteurs.....	51

a.	Les camptothécines .....	51
b.	Les indolocarbazoles .....	55
c.	Les indenoisoquinolines et les aromathécines .....	56
d.	Les dibenzonaphthyridinones.....	56
2.	Mécanisme d'action.....	57
a.	Stabilisation des complexes de clivage .....	57
b.	Formation des dommages à l'ADN.....	59
c.	Signalisation des dommages et mort cellulaire.....	61
3.	Déterminants de la réponse au traitement par inhibiteur de topoisomérase .....	62
a.	Accumulation des inhibiteurs de topoisomérase I dans les cellules.....	63
b.	Modification de la topoisomérase I.....	67
c.	Altération de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN.....	69
4.	Les inhibiteurs de topoisomérase I dans la prise en charge du neuroblastome .....	79
	<b>Partie . 3 Objectifs et plan de thèse .....</b>	<b>80</b>
	<b>RESULTATS .....</b>	<b>84</b>
	<b>Partie . 1 Etude de la voie de signalisation ALK-MDK.....</b>	<b>84</b>
I.	Article 1: Mutation-independent activation of the Anaplastic Lymphoma Kinase in neuroblastoma .....	85
1.	Introduction .....	86
2.	Patients and methods .....	87
3.	Results .....	90
4.	Discussion.....	99
II.	Article 2: Midkine signals through ALK and other receptors to promote the survival of neuroblastoma cells.....	107
1.	Introduction .....	108
2.	Materials and methods.....	110
3.	Results .....	112
4.	Discussion.....	122
	<b>Partie . 2 Etude phénotypique du modèle de résistance.....</b>	<b>129</b>
I.	Article 3: Acquired <i>in vivo</i> resistance to irinotecan in neuroblastoma is associated with genetic instability and quiescence.....	130
1.	Introduction .....	130
2.	Materials and methods.....	131

3. Results .....	134
4. Discussion.....	142
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>148</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>158</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>184</b>

# PREAMBULE

Les cancers de l'enfant diffèrent des cancers de l'adulte par leur rareté (1 % de tous les cancers), par la possibilité de régressions spontanées, par leurs taux de guérison élevés (plus de 75% des patients) et par le faible rôle que jouent les facteurs environnementaux sur leur développement. Il reste ainsi primordial d'identifier les facteurs induisant ce type de pathologie chez des sujets jeunes. L'utilisation de la chimiothérapie a permis d'améliorer considérablement les taux de guérison des enfants traités pour un cancer. Toutefois, certaines tumeurs restent des pathologies de mauvais pronostic pour lesquelles de nouveaux traitements sont nécessaires et le cancer représente toujours la première cause de décès par maladie chez l'enfant de plus d'un an. Avec les leucémies à haut risque, les sarcomes osseux et les tumeurs cérébrales malignes, le neuroblastome fait partie des tumeurs pédiatriques les plus fréquentes et difficiles à prendre en charge. Les efforts sur la méthodologie d'évaluation des agents anticancéreux chez l'enfant doivent être poursuivis.

Le neuroblastome est une tumeur extrêmement hétérogène sur le plan de la présentation clinique comme de son évolution à long terme. Alors que la moitié des cas sera d'évolution très favorable, pour l'autre moitié, cette maladie sera associée à un mauvais pronostic. Cette tumeur se caractérise notamment par une capacité importante à résister à la chimiothérapie.

Le travail de thèse a été conduit à l'Institut Gustave Roussy, UPRES EA 3535 « Pharmacologie et Nouveaux traitements des cancers » puis UMR8203 « Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses », sous la direction du Professeur Gilles Vassal. L'équipe du Professeur Gilles Vassal, co-dirigée par le Docteur Birgit Georger mène des projets de recherche visant à identifier puis inhiber à l'aide de traitements innovants, de nouvelles cibles thérapeutiques dans les cancers pédiatriques. Les travaux menés au cours de cette thèse s'inscrivent tout à fait dans cette thématique. Ils s'insèrent dans un projet développé au laboratoire il y a 15 ans, visant à développer l'utilisation des inhibiteurs de topoisomérase I dans le neuroblastome. L'efficacité anti-tumorale de ces agents contre le neuroblastome a été démontrée dans des études pré-cliniques puis cliniques de phase I et II. En revanche des mécanismes de résistance à ces drogues ont été rapportés dans des études de phase II, conduisant le laboratoire à étudier plus précisément ces phénomènes de résistance dans le neuroblastome. Un modèle murin de neuroblastome résistant *in vivo* à la chimiothérapie (aux inhibiteurs de topoisomérase I) a ainsi été développé au laboratoire. Celui-ci a été caractérisé



dans le but d'identifier des marqueurs prédictifs de réponse au traitement puis d'évaluer si l'inhibition des cibles identifiées pouvait restaurer la sensibilité au traitement. Le travail mené lors de cette thèse a permis, dans un premier temps de préciser l'implication de deux protéines (ALK et MDK) appartenant à une même voie de signalisation, dans le développement et la progression du neuroblastome. Il a également permis de poursuivre la caractérisation phénotypique du modèle de résistance pour localiser finement les mécanismes de résistance.

# INTRODUCTION

## Partie . 1 LE NEUROBLASTOME

### Une tumeur d'une extrême hétérogénéité

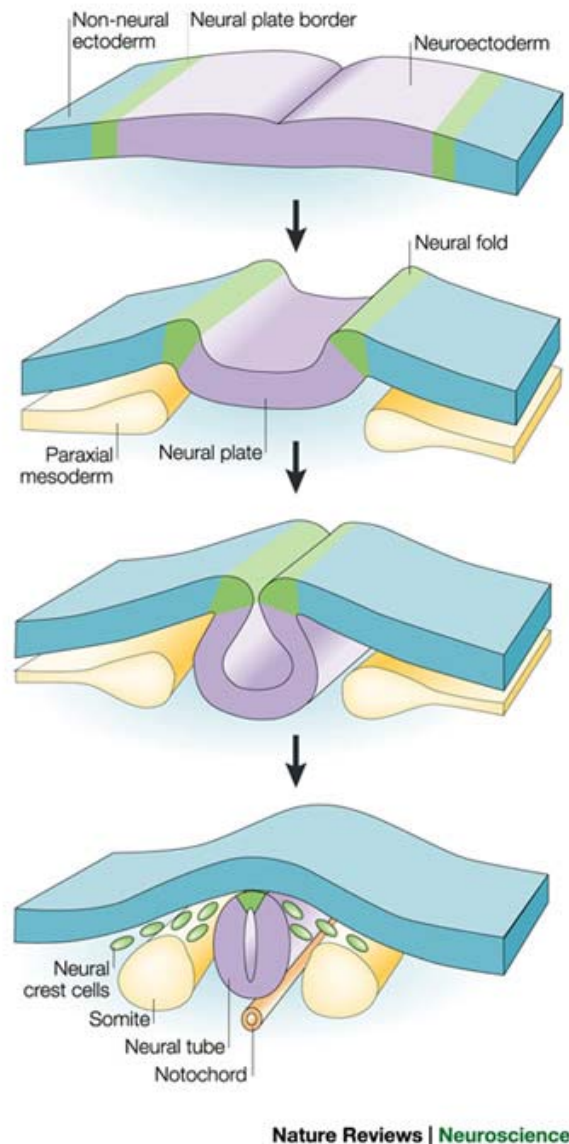
L'immense hétérogénéité du neuroblastome a toujours fasciné les oncologues (D'Angio et al., 1971 ; Evans et al., 1976). La notion d'hétérogénéité est particulièrement notable au niveau de la présentation clinique et des symptômes de la maladie.

Le neuroblastome a l'étrange pouvoir de régresser spontanément, de maturer ou bien de progresser de façon agressive. Le neuroblastome est associé à l'un des taux de régression spontanée et complète le plus élevé de tous les cancers (Carlsen, 1990) et même les formes métastatiques peuvent régresser complètement. Il a successivement été proposé que les comportements biologiques uniques de cette tumeur s'expliquaient directement par leurs propriétés biologiques (notamment par leur degré de maturation ou de différenciation) (Beckwith and Martin, 1968 ; Hughes et al., 1974). De plus, les comportements cliniques hétérogènes peuvent être expliqués par les nombreuses altérations génétiques retrouvées dans le neuroblastome. Enfin, la prise en compte de caractéristiques cliniques comme l'âge du patient et le stade d'extension de la maladie est également importante dans la prédiction du pronostic. Ainsi, les stratégies thérapeutiques actuelles sont-elles adaptées à l'ensemble de ces critères cliniques, génétiques et histologiques, critères qui sont en perpétuelle évolution. En effet, une des conséquences de l'hétérogénéité du neuroblastome se manifeste dans les nombreuses classifications qui ont successivement été proposées dans le monde au cours des dernières décennies.

### I. Initiation du neuroblastome

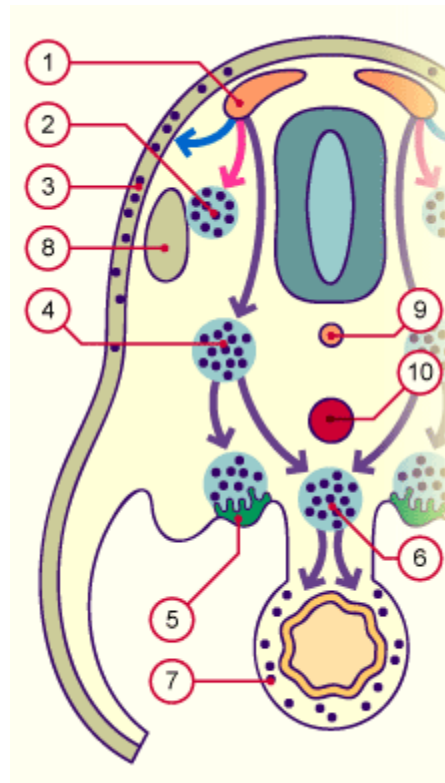
Le neuroblastome est une tumeur embryonnaire qui se développe à partir du système nerveux sympathique. La corrélation entre la distribution anatomique de cette tumeur et la localisation des annexes du système nerveux sympathique est forte (voir partie IV) et suggère que le neuroblastome est la manifestation maligne d'un développement anormal du système nerveux sympathique. La formation du système nerveux débute précocement au cours du développement embryonnaire (16ème jour après la fécondation) par l'étape de neurulation. Au cours de celle-ci, la plaque neurale se referme progressivement en gouttière neurale puis

en tube neural à la fin de la 3<sup>ème</sup> semaine de vie. A partir du tube neural, la crête neurale prend naissance (Figure 1).



**Figure 1** – Neurulation. Au cours de la neurulation, le bord de la plaque neurale (Neurale plate border, en vert) va former la plaque neurale (neural plate, en violet) puis le tube neural (neural tube, en violet). Les cellules de la crête neurale (neural crest cells, en vert) seront ensuite formées (Gammill and Bronner-Fraser, 2003).

Les cellules de la crête neurale sont pluripotentes et conduisent ainsi à la formation de différentes structures dont le système nerveux sympathique. La différenciation de ces cellules se déroule progressivement au cours de leur migration pour donner naissance à différents types cellulaires nerveux ou non (Figure 2).



- 1 crête neurale
- 2 ganglions et glie de la racine postérieure
- 3 cellules pigmentaires
- 4 ganglions et glie du tronc sympathique
- 5 glande surrénale en cours de développement
- 6 ganglions et glie préaortiques
- 7 ganglions et glie intraviscéraux
- 8 somite
- 9 notochorde
- 10 aorte

**Figure 2** – Migration des cellules de la crête neurale et principales structures issues de la crête neurale ([www.embryology.ch](http://www.embryology.ch)).

Nous citerons notamment les mélanocytes, la quasi-totalité des cellules du système nerveux périphérique (neurones des ganglions rachidiens, des ganglions sympathiques et parasympathiques et du système nerveux entérique) et des cellules de soutien comme les cellules de Schwann ou encore les cellules neurosécrétrices chromaffines de la medullo-surrénale (Harris and Erickson, 2007 ; Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2008).

Les mécanismes de formation, de migration et de détermination du lignage spécifique des cellules de la crête neurale sont mal connus à l'heure actuelle mais impliquent probablement un grand nombre de facteurs environnementaux. Un certain nombre de travaux se sont

concentrés sur les facteurs déterminant la différenciation des cellules du lignage sympatho-adrénergique. Des précurseurs sympatho-adrénergiques s'accumulent au niveau de l'aorte pour former les ganglions sympathiques primaires. La sécrétion de facteurs de croissance de la famille des Bone Morphogenetic Proteins (BMP) et des facteurs de transcription comme PHOX2B, MASH-1 et GATA-3 semblent indispensables pour une seconde différenciation de ces cellules, qui entameront une deuxième phase de migration. Lors de cette étape finale de différenciation, les précurseurs sympatho-adrénergiques donneront naissance à la fois aux neurones sympathiques, formant les ganglions sympathiques et aux cellules chromaffines, constituant la médullaire de la surrénale. Il est clair que l'expression de certains facteurs de transcription comme Sox8 et Sox10 (Reiprich et al., 2008) et des facteurs de croissance appartenant à la famille du *fibroblast growth factor* (FGF), du *nerve growth factor* (NGF) ou des glucocorticoïdes sont indispensables au contrôle spatio-temporel de la migration des cellules de la crête neurale vers la glande surrénale ou les ganglions sympathiques (Huber et al., 2009).

D'autre part, une signalisation complexe entre les protéines de la famille Hedgehog et Wnt est importante pour la formation de la crête neurale. Cette signalisation va induire l'expression de N-myc, un facteur de transcription largement exprimé dans la crête neurale et possédant un rôle majeur dans la progression dans le cycle cellulaire, dans la différenciation et l'apoptose. Il a été montré que ce gène est exprimé dans la crête neurale du poulet et son expression diminue lors de processus de migration au sein de la crête neurale (Wakamatsu et al., 1997). De façon intéressante, l'expression de gènes spécifiquement retrouvés dans le système nerveux sympathique en développement persiste dans le neuroblastome. Nous citerons N-myc, amplifié dans 30 % des neuroblastomes et associé à un mauvais pronostic (Brodeur, 2003). Un autre gène clé du développement du système nerveux autonome est PHOX2B, qui est d'autre part un gène de prédisposition au neuroblastome. Les récepteurs de la neurotrophine (TrkA, TrkB, et TrkC) et leurs ligands respectifs (NGF, BDNF et neurotrophin-3) sont des régulateurs de la survie, de la croissance et de la différenciation des cellules neurales. La régulation spatio-temporelle de leur expression peut affecter le développement du système nerveux. De plus, leurs expressions persistent dans les tumeurs neuroblastiques. Une expression élevée de TrkA est associée à des tumeurs neuroblastiques de pronostic favorable, avec une capacité de différenciation et d'apoptose élevée. En revanche, TrkB est exprimé dans les tumeurs présentant une biologie défavorable. L'expression de TrkB et de son ligand BDNF est d'autre part corrélée avec l'amplification de N-myc.

La persistance de l'expression de différents gènes du développement, la localisation primaire de la tumeur dans la glande surrénale et les ganglions sympathiques ainsi que la présence des enzymes du métabolisme des catécholamines dans les tissus neuroblastiques sont autant d'éléments qui font du neuroblastome une tumeur sympathique. Il est indispensable de prendre en compte ces caractéristiques pour comprendre la pathogénèse de cette maladie et traiter les enfants qui en souffrent.

## II. Etiologie

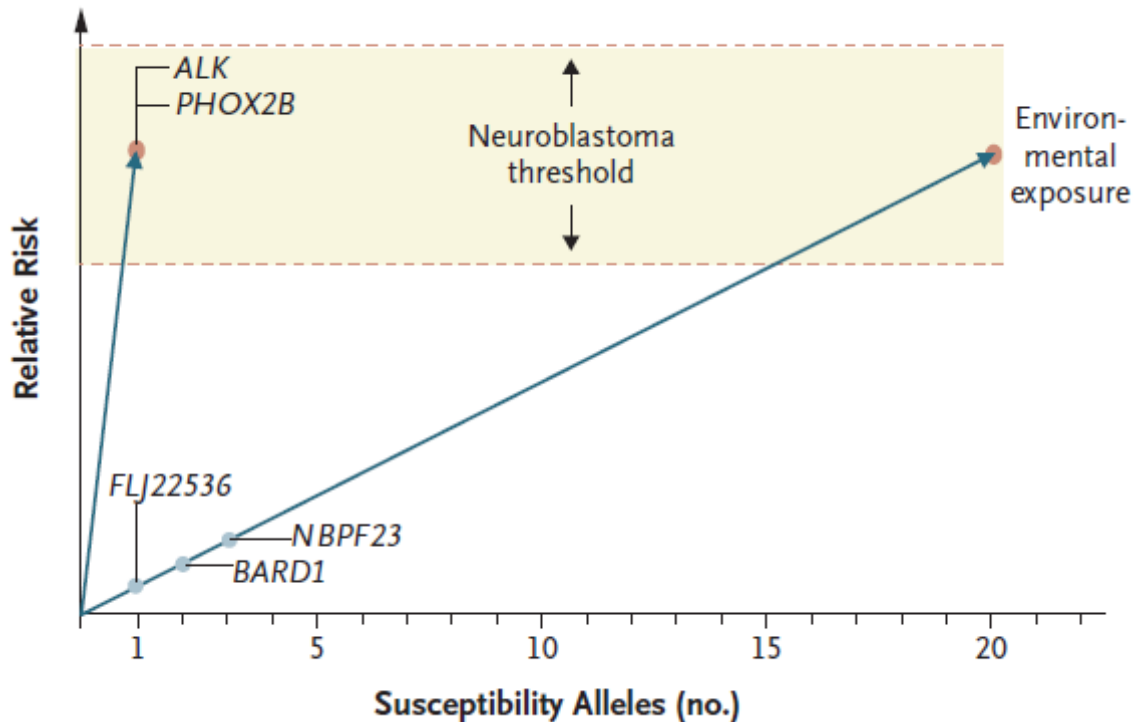
L'étiologie du neuroblastome n'est pas bien connue. Cette tumeur survient de façon sporadique dans la majorité des cas. Les neuroblastomes familiaux représentent seulement 1 à 2% des cas diagnostiqués. La transmission familiale s'effectue selon un mode autosomal dominant avec une pénétrance incomplète. D'autre part, des associations entre neuroblastome et neurocristopathies, des syndromes malformatifs congénitaux de la crête neurale sont bien connus. Nous citerons la maladie de Hirschsprung ou encore le syndrome congénital d'hypoventilation centrale. Ainsi, l'existence de neuroblastomes familiaux, même si cela reste rare et les taux de survenue de neuroblastome plus élevés en cas de syndromes congénitaux bien définis ont favorisé la recherche de gènes prédisposant au neuroblastome (Maris, 2010). En 1972, la notion de facteurs de prédisposition au neuroblastome a été soulevée pour la première fois en proposant un modèle génétique d'apparition du neuroblastome (Knudson and Strong, 1972). Le modèle avancé décrivait que la survenue de deux mutations consécutives favoriserait l'initiation de la tumeur. Les personnes prédisposées au neuroblastome développeraient ainsi la maladie plus tôt et sous forme multiple.

Le premier gène de prédisposition au neuroblastome identifié fut PHOX2B (*the transcription factor Paired-like Homeobox 2B*), un facteur de transcription codé par le gène situé en 4p12. PHOX2B joue un rôle clé au cours du développement du système nerveux autonome et des mutations de ce gène ont été retrouvées dans des cas familiaux et sporadiques de syndromes congénitaux d'hypoventilation centrale. Des mutations de ce gène ont ainsi été recherchées dans des cas de neuroblastome. Les résultats ont montré que des mutations germinales dans le locus de PHOX2B prédisposaient au neuroblastome dans des formes familiales (dans 6% des cas) (Bourdeaut et al., 2005) et dans de rares cas sporadiques (entre 2 et 4% des cas) (van Limpt et al., 2004 ; Serra et al., 2008). Pourtant, la faible pénétrance et la fréquence limitée de

ces mutations dans les cas familiaux et sporadiques suggèrent le rôle d'autres gènes de prédisposition.

Plus récemment, une seconde altération génétique en rapport avec l'initiation du neuroblastome a été identifiée. Elle concerne un gène situé en 2p23, codant pour ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*), un récepteur à Tyrosine Kinase (TK). Le rôle oncogénique de cette protéine a été identifié dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules (ALCL). 50 à 60 % des cas d'ALCL sont associés à la translocation chromosomique t(2;5)(p23;q35), générant un gène hybride formé du domaine intracellulaire (comprenant le domaine TK) de ALK et la région cytoplasmique de la nucléophosmine (NPM) (Morris et al., 1994 ; Duyster et al., 2001). S'en suit, l'expression d'une protéine de fusion NPM-ALK, possédant une activité TK constitutive. Il a été démontré que cette protéine avait un pouvoir transformant sur des cellules hématopoïétiques *in vitro* et induisait la formation de tumeurs *in vivo* (Turner and Alexander, 2005). D'autres protéines de fusion impliquant ALK ont ensuite été associées à l'initiation de différents cancers. Concernant le neuroblastome, des altérations de ALK de type mutations ou amplifications ont été mises en relation avec l'initiation de la maladie (Chen et al., 2008 ; George et al., 2008 ; Janoueix-Lerosey et al., 2008 ; Mosse et al., 2008). Des mutations localisées exclusivement dans le domaine TK, conduisant à l'activation constitutive de la protéine ont été retrouvées dans 80% des cas familiaux de neuroblastome ainsi que dans environ 10% des cas sporadiques (De Brouwer et al., 2010 ; Chen et al., 2008 ; George et al., 2008 ; Janoueix-Lerosey et al., 2008 ; Mosse et al., 2008).

Il faut noter que la pénétrance des altérations génétiques citées précédemment est incomplète dans les histoires familiales de neuroblastome. Et même si la quasi-totalité des cas familiaux de neuroblastome peut être corrélée à des mutations de ALK ou PHOX2B, ces altérations ne sont retrouvées que peu fréquemment dans les cas sporadiques. Il semble donc que d'autres variations génétiques entrent en ligne de compte dans l'initiation de la maladie. Des variations de type SNIP dans les gènes FLJ22536 et BARD-1 ont été associées récemment à une survenue plus fréquente de neuroblastome (Maris et al., 2008 ; Capasso et al., 2009) mais ces altérations génétiques restent à définir plus précisément. Ces données suggèrent également, comme récapitulé à la figure 3 que la susceptibilité au neuroblastome est régie par l'apparition d'altérations génétiques associée à l'exposition à des agents environnementaux (Maris 2010).



**Figure 3** – Modèle génétique de susceptibilité au neuroblastome : L’axe y représente le risque relatif de développer un neuroblastome et l’axe x le nombre d’allèles liés à une susceptibilité au neuroblastome. Le seuil génétique de développement de la maladie (genetic threshold) (choisi arbitrairement) est certainement modifié par l’exposition environnementale (Maris, 2010).

Un certain nombre d’études épidémiologiques se sont intéressées à l’influence de multiples facteurs environnementaux sur le développement du neuroblastome. Certaines études ont soulevé la présence de malformations congénitales (Foulkes et al., 1997 ; George et al., 2004) ou l’exposition à des médicaments durant la grossesse (Schuz et al., 2007 ; Johnson et al., 2008 ; Munzer et al., 2008) comme facteurs de risque accru du neuroblastome. En revanche, à ce jour, aucune étude n’a pu définir d’association formelle entre la survenue du neuroblastome et l’un des facteurs suspectés, cités précédemment.

### III. Incidence

Le neuroblastome représente en fréquence la 3ème tumeur de l’enfant après les leucémies puis les tumeurs cérébrales, comptant pour 29 et 23% des cancers pédiatriques respectivement. Le neuroblastome représente 8 à 10 % de tous les cancers diagnostiqués chez

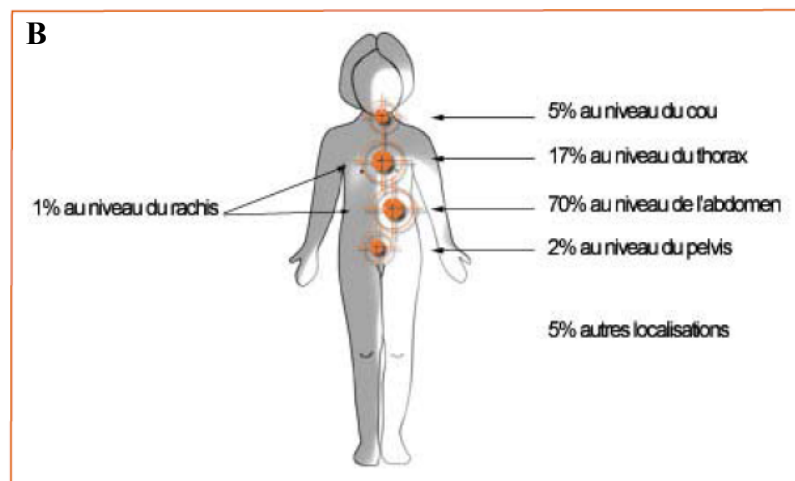
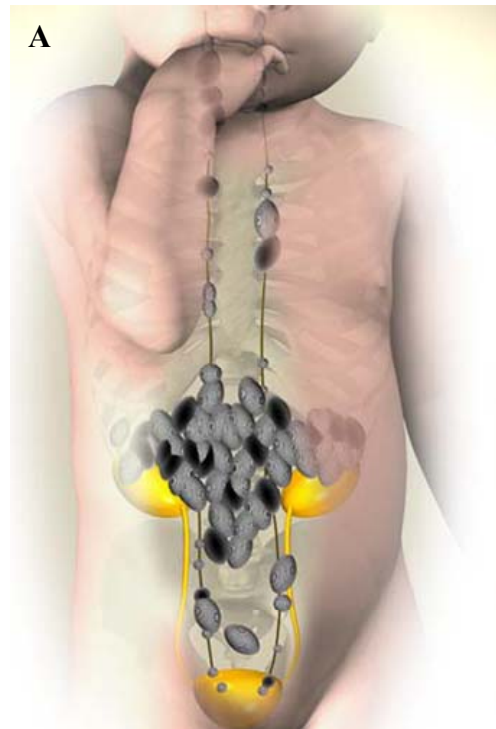


l'enfant. Il est responsable de 15 % des décès par cancer chez l'enfant. L'incidence des neuroblastomes est homogène dans les différentes parties du monde, elle est d'environ 10 cas pour 10<sup>6</sup> enfants par an chez les enfants de moins de 15 ans (Maris, 2010). Toutefois, l'incidence est un peu plus élevée dans les populations blanches et chez les garçons. L'âge médian au diagnostic est de 22 mois et 90 % des cas sont diagnostiqués avant l'âge de 5 ans (Brodeur et al., 1997).

Du fait de l'incidence relative élevée du neuroblastome, un programme de dépistage en masse, des nouveau-nés a été mis en place dans différents pays, notamment au Japon, en Allemagne, en Amérique du Nord et en France. Le neuroblastome est une tumeur qui sécrète des substances facilement détectables dans les urines. Ces programmes mesuraient les taux de ces substances à différents âges en fonction des pays (3 ou 4 mois et/ou 6 mois de vie). Ces études ont permis une détection plus importante de cas de neuroblastomes. En revanche, les cas identifiés se sont révélés être de très bon pronostic, avec des caractéristiques biologiques favorables pour la grande majorité d'entre eux. Ces cas n'auraient certainement eu aucune manifestation clinique ou auraient régressé spontanément. Ainsi, le dépistage n'a pas pu apporter de bénéfice quant à la réduction de la mortalité due aux neuroblastomes, qui est majoritairement liée aux neuroblastomes de mauvais pronostic, diagnostiqués après l'âge de 18 mois (Woods et al., 2002 ; Schilling et al., 2003 ; Tsubono and Hisamichi, 2004). Ces programmes de dépistage systématique ont donc été abandonnés.

#### **IV. Présentation clinique**

Cette tumeur touchant le lignage sympathico-adrénergique peut se développer tout le long de la chaîne nerveuse sympathique (Figure 4).



**Figure 4 – Localisations du neuroblastome.**

A. Les tumeurs neuroblastiques se localisent dans les différentes structures du système nerveux sympathique, incluant la médullaire de la glande surrénale, les ganglions et paraganglions sympathiques (Johnsen et al., 2009).

B. Fréquence de localisation du neuroblastome (D'Andon et al., 2004).

La majorité des tumeurs primaires (65%) se développe dans l'abdomen avec une localisation prépondérante au niveau de la médullaire de la glande surrénale. Le cou, le thorax et le pelvis représentent d'autres sites fréquents de localisation tumorale. Environ 70% des cas seront métastatiques au diagnostic. Les métastases se localisent majoritairement au niveau de la

moelle osseuse, des os, du foie, des ganglions lymphatiques et de la peau (Esiashvili et al., 2009). Les localisations variables de la tumeur primaire ainsi que la présence ou l'absence de métastases peuvent donner lieu à des manifestations cliniques diverses comme des douleurs abdominales ou des obstructions intestinales. Dans les formes métastatiques, les métastases dominent le tableau clinique. L'envahissement médullaire ou osseux aura comme retentissement une asthénie ou des douleurs osseuses.

## **V. Diagnostic**

Le diagnostic de neuroblastome est porté formellement dans plus de 90 % des cas par le dosage des métabolites urinaires des catécholamines (acide homovanylique, acide vanylmandélique et dopamine). Le scanner, l'échographie et l'IRM permettront ensuite de faire le bilan loco-régional de la maladie (D'Andon et al., 2004). De plus, une analyse anatomo-pathologique sera toujours réalisée. Cet examen est très important pour définir les facteurs pronostiques avant traitement. Ces facteurs seront détaillés plus tard (Paragraphe VI). La recherche de métastases principalement au niveau osseux ou médullaire sera également effectuée par biopsie ou à l'aide de la scintigraphie à la mIBG (méta-iodobenzylguanidine). L'équipement biochimique adrénérgique des cellules neuroblastiques leur permet d'incorporer un faux précurseur de la synthèse des catécholamines : la mIBG que l'on peut marquer à l'iode radioactif ( $^{123}\text{I}$ ). Cette scintigraphie révèle une fixation aussi bien sur la tumeur primitive que sur les métastases osseuses (Figure 5).



**Figure 5** – Scintigraphie à la métaiodobenzylguanidine (MIBG). Une fixation importante de la molécule peut être détectée dans une multitude de sites : les os et les tissus mous (Maris et al., 2007).

## **VI. Facteurs pronostiques**

Deux critères simples : le stade d'extension de la maladie et l'âge du patient au diagnostic sont des facteurs utilisés depuis très longtemps et qui gardent une signification majeure dans l'évaluation du risque de la maladie. D'autres facteurs histologiques et biologiques font aujourd'hui partie des classifications. En 2005, pour harmoniser la prise en charge des patients et pouvoir comparer les résultats des essais cliniques menés à travers le monde entier, un groupe d'experts, l'INRG (*International Neuroblastoma Risk Group*) s'est réuni pour

mettre en place une nouvelle classification clinique : l'INRGSS (*INRG Staging System*) (Ambros et al., 2009). En analysant les données de 8800 patients, ce groupe de travail a créé un consensus concernant les marqueurs pronostiques à utiliser dans le cadre des procédures opératoires standardisées (Standardised Operating Procedures (SOPs)). Un nouveau système se basant sur des facteurs préopératoires homogènes, plus robustes et reproductibles a été mis en place dans le but de stratifier les patients au moment du diagnostic avant tout traitement.

## **1. Stade d'extension de la maladie et facteurs de risque associés à la chirurgie**

L'INRGSS définit 4 stades d'extension tumorale selon des critères définis avant tout acte chirurgical.

Le stade L1 (ancien stade 1 (INSS)) caractérise des tumeurs localisées à un seul compartiment du corps (cou, cage thoracique, abdomen ou pelvis). Ces tumeurs ne doivent pas intégrer des structures vitales, c'est-à-dire ne pas présenter de facteurs de risque opératoires.

Les tumeurs de stade L2 (anciens stades 2 et 3 (INSS)) sont locorégionales et montrent des signes d'invasivité locale et présentent un ou plusieurs facteurs de risque à la chirurgie.

Le stade M (ancien stade 4 (INSS)) est défini comme une maladie présentant des métastases (qui ne sont pas en continuité avec la tumeur primaire).

Les tumeurs de stades MS (ancien stade 4S (INSS)) sont les maladies métastatiques chez les patients de moins de 18 mois (547 days), avec des métastases localisées exclusivement au niveau de la peau, du foie et de la moelle osseuse (moins de 10% d'envahissement à la biopsie et la mIBG devant être négative dans les os et la moelle).

A partir de ces 4 stades d'extension et en y intégrant différents facteurs cliniques et biologiques (âge, histologie, altération de la région 11q), 16 groupes pronostiques ont pu être définis. Ces groupes de risque ont été répertoriés par des lettres auxquelles correspondent un taux de survie sans événement à 5 ans et la proportion de patients parmi tous les patients diagnostiqués pour un neuroblastome (Table 1). La définition précise des caractéristiques de chacun des groupes (de A à R) est donnée dans la Table 2.

Nom du sous-groupe	Risque associé	Taux de survie à 5 ans (%)	Proportion de patients (%)
A, B, C	Very low	> 85	28,2
D, E, F	Low	> 75 to ≤ 85	26,8
G, H, I, J	Intermediate	≥ 50 to ≤ 75	9,0
K, N, O, P, Q, R	High	< 50	36,1

**Table 1** – Proportion de patients dans chaque sous-groupe pronostic en fonction des taux de survie à 5 ans associés (Cohn et al., 2009).

## 2. Age du patient au diagnostic

Plus l'âge au diagnostic est avancé, plus la probabilité de survie du patient est basse. Les neuroblastomes localisés (stades L1 et L2) sont le plus souvent associés à un bon pronostic quel que soit l'âge du patient. En revanche, le pronostic des neuroblastomes métastatiques (stades M) est très fortement dépendant de l'âge du patient. Le seuil pronostique est officiellement fixé à 18 mois mais le seuil de 12 mois est encore souvent utilisé comme référence pour les patients touchés par une maladie de mauvais pronostic. Les enfants atteints d'un neuroblastome de stade M diagnostiqué avant l'âge de 12 mois auront un pronostic largement meilleur (taux de survie de 50 à 75%) que des enfants souffrant d'une maladie au même stade, diagnostiquée après 12 mois (leur taux de survie ne dépassera pas les 30%) (De Bernardi et al., 1992).

## 3. Données anatomo-pathologiques

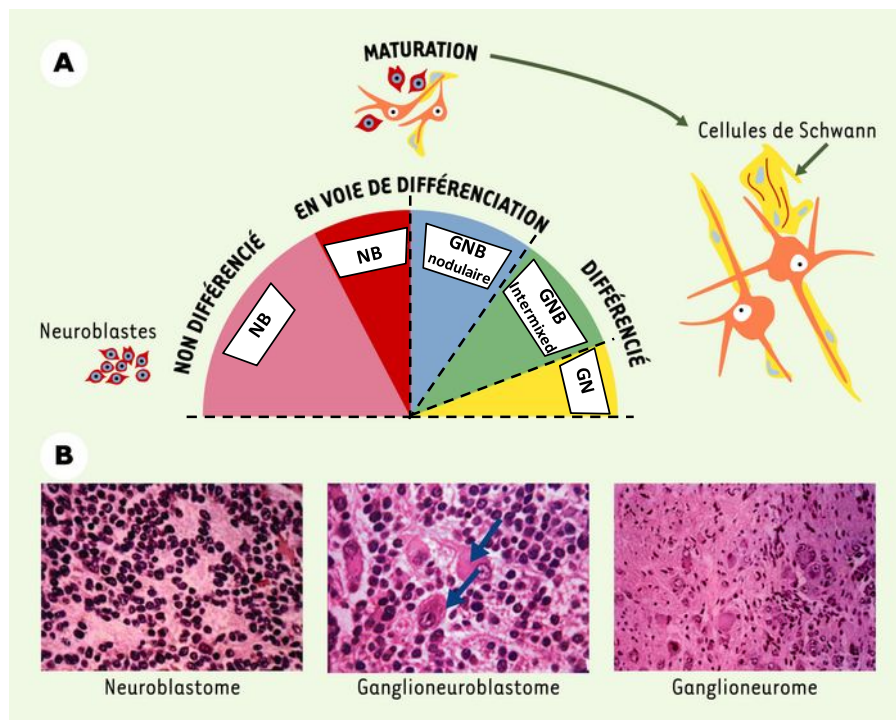
Le neuroblastome a l'étrange capacité de pouvoir régresser spontanément, de maturer ou bien de progresser de façon agressive. Ceci pourrait s'expliquer par leur processus de maturation ou de différenciation, allant des cellules neuroblastiques (les moins différenciées) vers des cellules ganglionnaires (les plus différenciées). La différenciation du neuroblastome est corrélée à une moindre agressivité tumorale.

L'intégration des caractérisations histologiques dans la classification a permis d'améliorer la stratification des patients en fonction de leur risque pronostique.

Le premier critère de catégorisation repose sur la présence de stroma Schwannien et le degré de différenciation des cellules neuroblastiques

Les tumeurs sont classées en quatre grandes catégories (figure 6) :

- Les neuroblastomes (NB), pauvres en stroma.
- Les ganglioneuroblastomes (GNB) nodulaires, stroma mixte riche et pauvre
- Les ganglioneuroblastomes mélangés («intermixed»), stroma riche
- Les ganglioneuromes (GN), stroma dominant



**Figure 6** – Classification histologique des tumeurs neuroblastiques.

A. De gauche à droite: NB (neuroblastome), formé de petites cellules (neuroblastes malins) non différenciées puis en voie de différenciation; GNB (ganglioneuroblastome) nodulaire et intermixed, formé de cellules sympathiques différenciantes plus grosses, et de quelques cellules de Schwann; GN (ganglioneurome), formé de grosses cellules ganglionnaires sympathiques totalement différenciées, prolongées par des extensions neuritiques et entourées de cellules de Schwann.

B. Caractères histologiques des coupes de tumeurs neuroblastiques colorées à l'hématoxyline-éosine. De gauche à droite: tumeur immature ou neuroblastome à stroma schwannien pauvre; ganglioneuroblastome (les flèches indiquent les cellules différenciées) à stroma schwannien riche; ganglioneurome à stroma schwannien dominant (Adapté de Douc-Rasy et al., 2004).

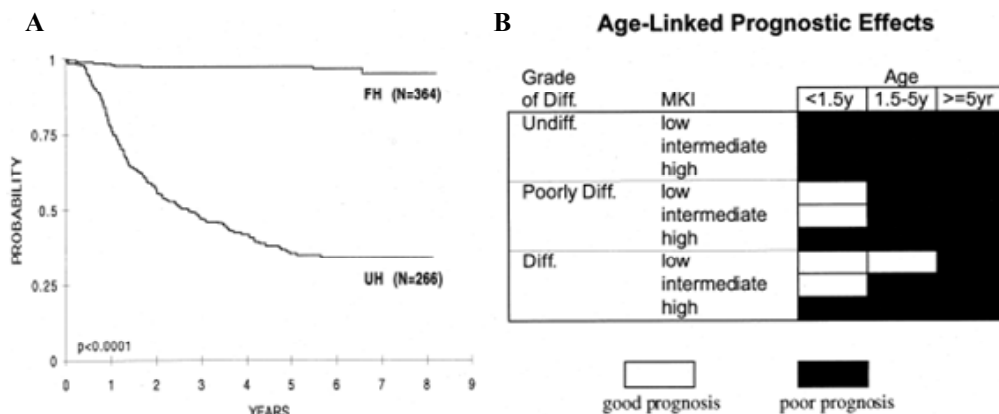
### L'index mitotique et carrhyorectique (MKI) sera ensuite considéré

Le MKI représente le nombre de mitoses et de carrhyorexie pour 5 000 cellules, où la carrhyorexie représente la fragmentation destructrice du noyau au cours de la mort cellulaire. Trois classes de MKI sont fixées : bas, intermédiaire et élevé.

### L'âge du patient au diagnostic sera également pris en compte

Le seuil de 18 mois (1,5 ans) reste un facteur pronostique primordial dans la classification histologique.

En combinant les différents critères énoncés (âge, contenu en stroma, grade de différenciation neuroblastique et MKI), cette classification permet de classer l'ensemble des patients en deux groupes pronostiques, celui d'histologie favorable (favorable histology, FH) et celui d'histologie défavorable (unfavorable histology UH) (Figure 7) (Shimada et al., 2001).



**Figure 7** – Evaluation du pronostic en fonction de l'INRGSS

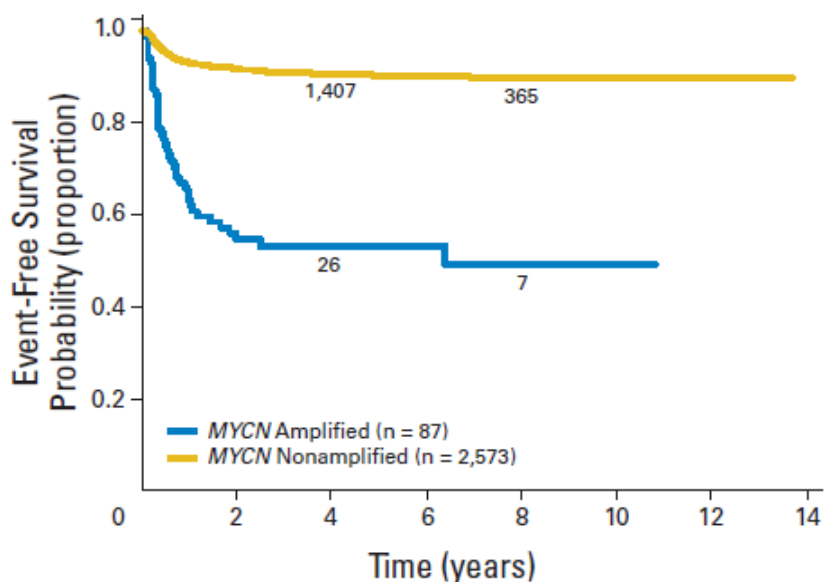
- Courbe de survie sans événement en fonction des caractéristiques histologiques des tumeurs. FH = Histologie favorable et UH = Histologie défavorable.
- Pronostic des patients en fonction du stade de différenciation (Diff.: différencié, Undiff. : indifférencié, Poorly Diff. : faiblement différencié) et du MKI (index mitotique et carrhyorectique) (low : faible, intermediate : intermédiaire et high : élevé) (Shimada et al., 2001).



## 4. Caractéristiques génétiques

### a. Amplification de l'oncogène N-myc

Le gène N-myc est situé au niveau du locus 2p24 et code pour un facteur de transcription. Il s'agit d'une oncoprotéine de la famille myc, baptisée N-myc pour Neuroblastome. Ce gène est amplifié dans environ 20% des cas de neuroblastome. L'amplification de ce gène (au-delà de 10 copies) représente ainsi un facteur de stratification essentiel du neuroblastome. En effet quel que soit le stade de la maladie et l'âge du patient, l'amplification de N-myc corrèle avec un mauvais pronostic, une progression tumorale rapide et un risque élevé de rechute (Seeger et al., 1985 ; Moreau et al., 2006 ; Bagatell et al., 2009 ; Ambros et al., 2009 ; Cohn et al., 2009) (Figure 8) (Table 2).



**Figure 8** – Comparaison des courbes de survie sans évènement chez des patients de stades L1 et L2 présentant (courbe bleue) ou ne présentant pas d'amplification de N-myc (courbe jaune). La différence entre les tumeurs amplifiant ou n'amplifiant pas N-myc est statistiquement significative avec des taux de survie sans évènement de 53% contre 90%, respectivement,  $p < 0,001$  (Bagatell et al., 2009).

### b. Délétion de la région 11q

Parmi les nombreuses altérations chromosomiques auxquelles le neuroblastome est susceptible, les remaniements de la région 11q : des translocations, des inversions ou plus fréquemment des délétions représentent un biomarqueur pronostique particulièrement

puissant (Westermann and Schwab, 2002). En effet, la perte de la région 11q est retrouvée dans 35 à 45% des tumeurs sporadiques (Guo et al., 1999 ; Plantaz et al., 2001). Elle est associée aux tumeurs de haut risque. Elle est corrélée de façon inverse à l'amplification de N-myc. Ce marqueur a donc une utilité majeure concernant les cas n'amplifiant pas N-myc (Attiyeh et al., 2005 ; Cohn et al., 2009) (Table 2).

INGR stage	Age (mo)	Histologic category	Grade of tumor differentiation	MYCN	11q aberration	Ploidy	Pretreatment risk group		
L1/L2		GN maturing; GNB intermixed				A	Very low		
L1		Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA		B	Very low		
L2	<18	Any, except GN maturing or GNB intermixed		Amp	No	K	High		
				NA		D	Low		
	≥18	GNB nodular; neuroblastoma	Differentiated	NA	Yes	G	Intermediate		
			Poorly differentiated or undifferentiated	NA	No	E	Low		
				NA	Yes	H	Intermediate		
M	<18			Amp		Hyperdiploid	N	High	
				NA			F	Low	
	12-<18				NA		Diploid	I	Intermediate
					NA			J	Intermediate
	<18				Amp			O	High
≥18							P	High	
MS	<18				No		C	Very low	
				NA	Yes		Q	High	
				Amp			R	High	

**Table 2** – Ensemble des critères reconnus par l'INRGSS pour définir le risque associé aux différents cas de neuroblastome. L'ensemble de ces critères a permis de définir des sous-groupes de patients désignés par des lettres (allant de A à R) et associés à un risque pronostic. Abréviations : Very low = très faible ; Low = faible ; Intermediate = intermédiaire ; High = élevé ; GN : ganglioneurome ; GNB : ganglioneuroblastome ; NA : non-amplifié ; AMP : amplifié (Esiashvili et al., 2009).

### c. Contenu en ADN, ploïdie des cellules

La détermination de la ploïdie cellulaire ou contenu en ADN permet de répertorier deux catégories : les tumeurs diploïdes/tétraploïdes et les tumeurs hyper-diploïdes/triploïdes. La majorité des tumeurs ont un contenu en ADN hyper-diploïde (penta ou hexaploïde) (Look et al., 1984 ; Kaneko, 1987 ; Look et al., 1991). Il a été montré que les tumeurs de pronostic favorable avaient un défaut de mitoses, ce qui est associé à des gains ou pertes de chromosomes entiers. Ainsi il est admis que les tumeurs hyper-diploïdes corrélaient avec un

pronostic favorable (Spitz et al., 2006). En revanche, les tumeurs défavorables présentent une instabilité génétique accrue, favorisant les réarrangements chromosomiques, les translocations et ainsi la maintenance d'un contenu en ADN proche de la ploïdie (Maris et al., 2007).

## VII. Traitements

A l'heure actuelle, un défi majeur des cliniciens est de choisir le traitement et surtout l'intensité du traitement. Ainsi, les stratégies thérapeutiques actuelles ajustent l'intensité des traitements en fonction du risque associé à chaque tumeur individuellement (bas, intermédiaire, haut et les stades 4s sont mis à part) (Table 3). Pour les patients associés à un risque faible, un traitement modéré voire une simple surveillance sera préconisé. Ceci vise à limiter les toxicités à long terme associées aux traitements. A l'opposé, d'autres tumeurs progresseront extrêmement rapidement même sous traitement intensif et donneront lieu à des intensifications thérapeutiques.

Variable	Prognostic Category*			
	Low Risk	Intermediate Risk	High Risk	Tumor Stage 4S
Pattern of disease	Localized tumor	Localized tumor with locoregional lymph-node extension; metastases to bone marrow and bone in infants	Metastases to bone marrow and bone (except in infants)	Metastases to liver and skin (with minimal bone marrow involvement) in infants
Tumor genomics	Whole-chromosome gains	Whole-chromosome gains	Segmental chromosomal aberrations	Whole-chromosome gains
Treatment	Surgery†	Moderate-intensity chemotherapy; surgery†	Dose-intensive chemotherapy, surgery, and external-beam radiotherapy to primary tumor and resistant metastatic sites; myeloablative chemotherapy with autologous hematopoietic stem-cell rescue; isotretinoin with anti-GD2 immunotherapy	Supportive care‡
Survival rate (%)	>98	90 to 95	40 to 50	>90

**Table 3** - Stratégie thérapeutique en fonction du risque associé au neuroblastome, défini par les caractéristiques phénotypiques et génétiques de la tumeur et taux de survie associé à chaque groupe pronostique (Adapté de Maris, 2010).

La chimiothérapie occupe une place centrale dans la prise en charge thérapeutique des neuroblastomes. Pour les patients de risque intermédiaire, la chimiothérapie peut inclure le carboplatin, l'étoposide, le cyclophosphamide et la doxorubicine pour une durée allant de 2 à 8 cycles, en fonction des caractéristiques biologiques et de la réponse au cours du traitement.

La catégorie de tumeurs associée à un risque élevé reste particulièrement difficile à prendre en charge. La stratégie thérapeutique actuelle pour les tumeurs de haut risque intègre quatre phases de traitement. Une chimiothérapie d'induction, visant à réduire la taille de la tumeur est initiée avant son exérèse par chirurgie, suit ensuite une phase thérapeutique de consolidation pour finir avec l'éradication de la maladie résiduelle à l'aide un traitement de maintenance (revu par Esiashvili et al., 2009 et Maris, 2010). La chimiothérapie d'induction couramment utilisée repose sur des cycles (de 4 à 7) de cisplatine et etoposide en alternance avec la vincristine, la doxorubicine et le cyclophosphamide (Kushner et al., 1994). Plus récemment, le topotecan a été ajouté dans le cocktail de chimiothérapie de la phase d'induction, pour les neuroblastomes réfractaires ou en rechute (Park et al., 2011). Après résection chirurgicale, la phase de consolidation passera par l'administration d'une chimiothérapie haute dose, comprenant notamment des agents alkylants comme le busulfan et le melphalan. Celle-ci consiste en l'administration d'une chimiothérapie à dose myéloablatrice suivie rapidement d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques autologues ; ce qui permet d'améliorer nettement le pronostic (Yalçın et al., 2010).

A côté de la chimiothérapie, la chirurgie et la radiothérapie représentent des outils essentiels. Notamment pour les patients de risque intermédiaire ou de haut risque (qui représentent plus de 50 % des neuroblastomes diagnostiqués). Pour ces patients, une résection chirurgicale la plus importante possible est recommandée en première intention ou après une chimiothérapie néoadjuvante, visant à réduire la taille de la tumeur avant extraction. Pour ces patients, la radiothérapie pourra également être préconisée mais elle est principalement réservée aux tumeurs en rechute ou en progression. En revanche, l'intérêt de la chirurgie et de la radiothérapie pourra être remis en cause pour les patients présentant des tumeurs de bon pronostic.

## **VIII. Limiter les rechutes et comprendre les mécanismes potentiels de résistance**

### **1. Les traitements de maintenance pour limiter les rechutes**

Des cellules cancéreuses peuvent se nicher dans l'organisme (la moelle ou les os généralement), expliquant les échecs thérapeutiques et les rechutes des patients. Généralement les neuroblastomes de haut risque répondent très bien à la chimiothérapie (une réponse significative est obtenue pour 70% à 80% des patients lors de la phase de consolidation) mais rechutent très souvent (Esiashvili et al., 2009). En effet, malgré l'utilisation de traitements intensifs, plus de la moitié des neuroblastomes de haut risque connaîtront des rechutes et la survie à 5 ans de ces patients reste inférieure à 50% (Maris, 2010). Le neuroblastome est une maladie chimiosensible mais chimiocurable seulement dans un cas sur deux. Au cours des rechutes, les tumeurs répondent souvent moins bien au traitement. Des phénomènes de résistance acquise ainsi que la sélection de clones tumoraux résistants seraient les obstacles majeurs à un traitement efficace. Des techniques permettant d'évaluer la « charge » tumorale, en isolant et purifiant les cellules tumorales résiduelles ou en détectant des marqueurs tumoraux très spécifiques, permettraient de mieux comprendre et suivre la maladie résiduelle.

Pour lutter contre ces rechutes, un traitement de maintenance, de longue durée, est réalisé.

Les rétinoïdes représentent un outil essentiel de la phase de maintenance. Ces molécules stimulent la différenciation et la maturation des neuroblastes. L'utilisation de rétinoïdes tels que l'acide 13-cis-rétinoïc ou l'isotrétinoïne améliore significativement la survie des patients (Matthay et al., 2009).

En complément des rétinoïdes, le recours à des immunothérapies se développe de plus en plus. Les cellules neuroblastiques expriment fortement un antigène de surface : le dialoganglioside 2 (GD2). Des anticorps monoclonaux murins, et des anticorps chimériques humains/murins dirigés contre ce marqueur membranaire sont actuellement en développement dans le traitement des neuroblastomes réfractaires. Des essais cliniques de phase I (Osenga et al., 2006) ont démontré une bonne tolérance de ces composés. Ensuite, des essais cliniques de phase II ont démontré leur efficacité en association avec des cytokines comme l'interleukin-2 (IL-2) ou le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) et améliorent considérablement la survie des patients (Gilman et al., 2009 ; Yu et al., 2010). Ces cytokines intensifient la réponse cytotoxique cellulaire médiée par les anticorps (Hank et al., 1990 ; Barker et al., 1991).

La thérapie radiométabolique à la méta-iodobenzylguanidine hautement radioactive ( $^{131}\text{I}$  mIBG) représente une stratégie nouvelle dans la phase de maintenance. La  $^{131}\text{I}$  mIBG se concentre dans les cellules produisant les catécholamines, donc à la fois la tumeur primaire neuroblastique et les métastases. De nombreux essais cliniques ont rapporté l'intérêt d'utiliser cette modalité de traitement, offrant des taux de réponse allant jusqu'à 50 % (Hartmann et al., 1987 ; Matthay et al., 2007). En plus d'apporter des résultats prometteurs, cette méthode de traitement semble présenter très peu d'effets secondaires.

## 2. Comprendre les mécanismes potentiels de résistance

Tous les neuroblastomes, même métastatiques répondent bien à la chimiothérapie initiale mais les rechutes sont fréquentes (plus de la moitié des tumeurs de haut risque) et souvent accompagnées de l'acquisition de phénomènes de résistance à la thérapie. De façon fréquente, les tumeurs de haut risque s'orientent vers des phénotypes de résistance contre de multiples classes d'agents cytotoxiques (classiquement : les anthracyclines, les vinca-alkaloïdes, les taxanes et les epipodophyllotoxines). Il s'agit du syndrome de résistance multi-drogue (*Multidrug resistance* (MDR)), qui peut être acquis ou intrinsèque et qui rend la prise en charge de ces tumeurs très difficile. Ceci entraîne le plus souvent la progression tumorale, suivie de la mort des patients. Beaucoup d'études se sont intéressées à la compréhension des mécanismes sous-jacents à cette résistance et plusieurs pistes ont été soulevées.

Certaines pompes d'efflux, ou ATP-binding cassette (ABC) sont exprimées dans les tumeurs neuroblastiques. Ces protéines membranaires sont chargées de transporter des substances endogènes ou exogènes, comme des xénobiotiques à l'extérieur de la cellule. L'exposition cellulaire au traitement s'en trouve ainsi réduite.

Deux protéines membranaires de la super-famille des transporteurs multi-drogues et plus précisément de la famille des *Multidrug Resistance-associated Protein* (MRP) auraient un lien avec le comportement clinique des neuroblastomes résistants. La protéine qui a suscité le plus de travaux est MRP1. En 1994, il a été montré que la sur-expression de ce transporteur corrélait avec un mauvais pronostic et à l'amplification de l'oncogène N-myc (Bordow et al., 1994). De plus, MRP1 est décrit comme un gène cible de N-myc (Manohar et al., 2004).

Plus tard, le rôle de MRP1 dans la *résistance* du neuroblastome a été démontré *in vitro* et *in vivo* (Kuss et al., 2002 ; Pajic et al., 2005). Parmi les drogues prises en charge par MRP1, on

retrouve notamment l'etoposide, la doxorubicine ou encore la vincristine, largement intégrés dans le traitement du neuroblastome (Hipfner et al., 1999).

De la même façon, l'expression du transporteur MRP4 est corrélée à un mauvais pronostic et à l'amplification de N-myc. Il est décrit que la sur-expression de cette protéine confère une résistance à un inhibiteur de topoisomérase I, l'irinotecan, au moins *in vitro* (Norris et al., 2005).

Un défaut d'induction d'apoptose a également été proposé comme mécanisme à l'origine de la résistance. En effet, dans les cellules saines, un équilibre très fin régule le niveau d'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques. Dans les cellules cancéreuses, incluant le cas du neuroblastome, l'équilibre peut se retrouver déplacé vers une augmentation du processus anti-apoptotique (Goldsmith and Hogarty, 2005 ; Johnsen et al., 2009).

Le processus apoptotique est extrêmement complexe. Il est orchestré par des protéases appelées caspases, gérant la protéolyse de différents substrats conduisant à la mort cellulaire. Il peut être déclenché par deux voies : la voie extrinsèque, faisant intervenir les récepteurs membranaires de mort et une voie mitochondriale intrinsèque, libérant des protéines de la famille Bcl-2.

Un défaut en caspase 8 (dû à une délétion ou une méthylation du gène, empêchant son expression) est observé dans un grand nombre de neuroblastome de haut risque (Lázcoz et al., 2006). Cette perte d'expression semble corrélée à un mauvais pronostic et à l'amplification de N-myc (Teitz et al., 2000 ; Pingoud-Meier et al., 2003 ; Yang et al., 2007).

Des diminutions d'activité pro-apoptotique de la voie intrinsèque sont également constatées dans les tumeurs neuroblastiques de mauvais pronostic. L'activation constitutive de signaux de survie pourrait entraîner la résistance. Notamment, la sur-expression de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique est corrélée à un mauvais pronostic dans le neuroblastome (Goldsmith and Hogarty, 2005 ; Fulda and Debatin, 2003 ; Abel et al., 2005).

L'implication de la survivine, une molécule de la famille des IAPs (*Inhibitors of apoptosis proteins*) a également été étudiée. Il s'agit d'une protéine cytosolique capable d'inhiber l'action des caspases. Le gène codant pour la survivine se situe en 17q25, une région également fréquemment gagnée dans le neuroblastome. L'expression de cette protéine corrèle avec des caractéristiques tumorales de mauvais pronostic (Islam et al., 2000).

De plus, un couple ligand-récepteur, le BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) et TrkB, véhicule des signaux de survie dans les cellules neuronales saines (Miller and Kaplan, 2001). Des taux protéiques élevés de ces deux acteurs sont retrouvés dans les neuroblastomes de haut

risque (Nakagawara et al., 1994). En revanche, les tumeurs de bon pronostic expriment des taux élevés de NGF et TrkA, un couple ligand-récepteur (de la même famille que BDNF et TrkB) qui semble capable d'induire des signaux de mort apoptotique, conduisant à la régression tumorale (Nakagawara et al., 1993).

Le gène p53, suppresseur de tumeur est très fréquemment muté dans les cancers de l'adulte mais cette mutation est très rarement retrouvée dans les cancers pédiatriques, dont les neuroblastomes (Brodeur, 2003). En revanche, la fréquence relative de cette mutation augmente au cours des rechutes, indiquant son rôle potentiel dans l'acquisition d'un phénotype résistant (Keshelava et al., 2001 ; Tweddle et al., 2001).

## **IX. Autres classifications et nouvelles cibles thérapeutiques**

### **1. De nouveaux outils pour identifier de nouveaux marqueurs**

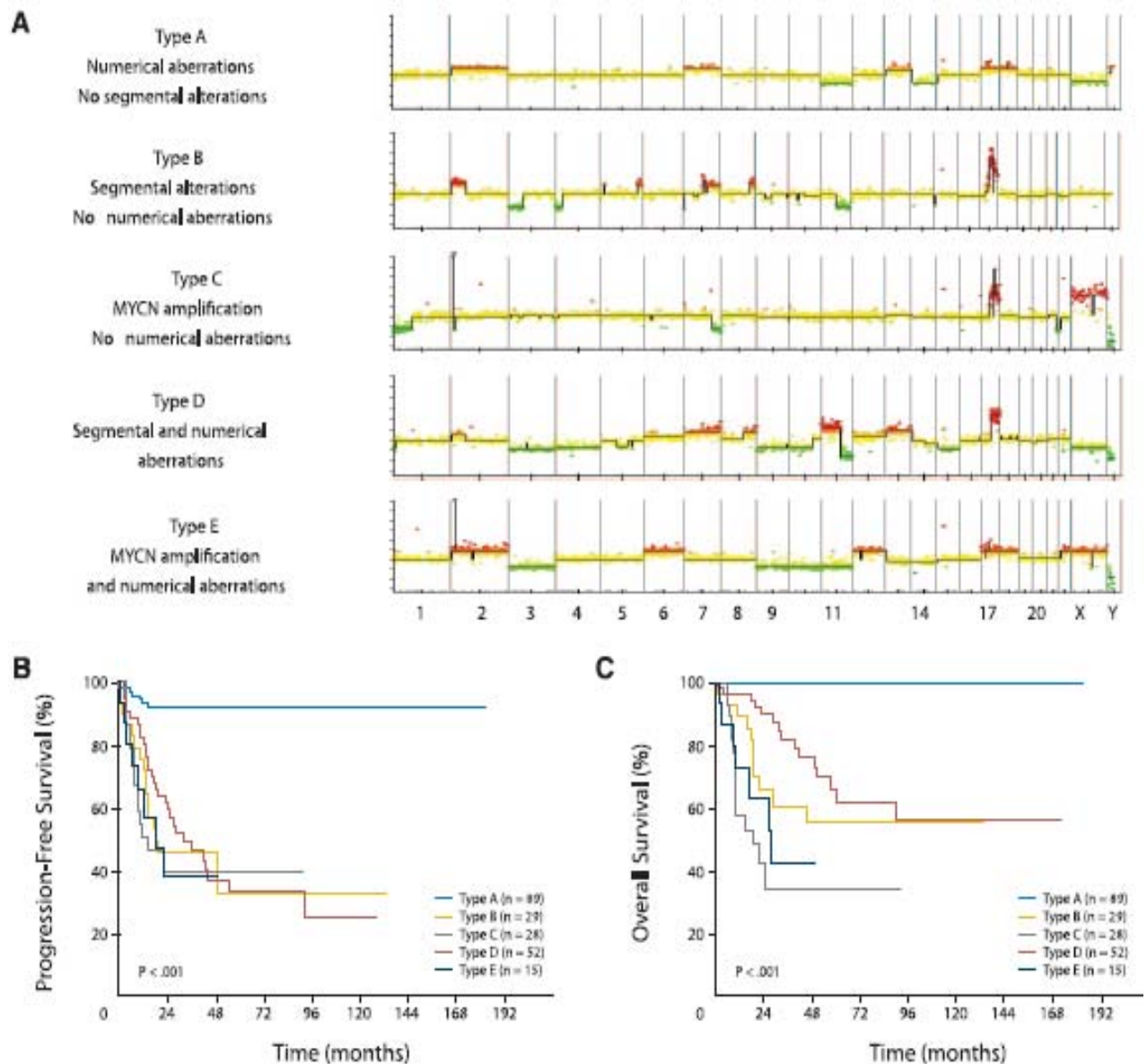
Des techniques récentes haut débit comme le microarray (pour analyser le transcriptome ou faire du génotypage), la CGH-array (hybridation génomique comparative), le séquençage de nouvelle génération ou la phosphoprotéomique ont permis de disséquer la biologie des neuroblastomes et d'identifier de nouveaux marqueurs protéiques ou épigénétiques. Il est particulièrement intéressant d'utiliser ces techniques pour mieux caractériser les tumeurs de haut risque. Malgré l'amélioration des thérapies, elles sont toujours associées à des taux de mortalité atteignant 70%. En effet, les efforts d'harmonisation des classifications et une meilleure connaissance de la biologie des tumeurs ont permis d'améliorer la survie des patients atteints de neuroblastome, particulièrement ceux de pronostic déjà assez favorable. En revanche, les chances de survie des patients souffrant d'un neuroblastome de haut risque se sont peu améliorées. Ceci explique les recherches intenses menées sur le neuroblastome pour comprendre sa biologie depuis plus de 20 ans et développer de nouveaux traitements.

Ainsi différentes études ont mis à profit les nouvelles technologies haut-débit pour définir des profils génomiques permettant d'affiner la prévision du risque associé à ces tumeurs. Il est particulièrement délicat pour les praticiens de stratifier les patients avec des neuroblastomes de haut risque et de choisir le traitement le plus adapté. Les différentes études menées ont pu montrer que l'établissement d'une signature moléculaire de ces tumeurs permettait d'affiner leur répartition en 2 catégories. Tout d'abord, les tumeurs de signature moléculaire « favorable », recevront une thérapie à dose réduite, permettant ainsi de réduire la morbidité et mortalité liées aux toxicités des traitements, qui sont répertoriées dans 23% des cas. A



l'inverse, une signature moléculaire « défavorable » conduira vers une thérapie haute dose et l'orientation des patients vers des essais cliniques pour bénéficier de nouvelles thérapies (Wei et al., 2004 ; Ohira et al., 2005 ; Oberthuer et al., 2006 ; Asgharzadeh et al., 2006). Une étude génomique (Vermeulen et al., 2009) incluant un nombre très important de patients (n=579) a permis de définir et surtout de valider la robustesse d'une signature génique composée de 59 gènes pour affiner la prédiction du pronostic des patients. Des groupes de patients à risque moléculaire élevé ou faible sont ainsi définis. Cette signature apparaît comme un facteur prédictif indépendant et complémentaire des classifications actuelles en permettant l'identification au sein même de groupes prédéfinis de tumeurs associées à un risque de décès encore plus élevé. Ces signatures géniques ne sont pas encore passées dans la prise en charge standard des patients.

D'autres approches par CGH-array ont permis d'évaluer sur puce les variations du nombre de copies de chaque chromosome (Janoueix-Lerosey et al., 2009). Ainsi, différents sous-groupes de tumeurs associés à des pronostics différents ont pu être formés à partir du type d'altération chromosomique identifié par le profil génomique de la tumeur. Deux types majeurs d'altérations ont été retenus comme pertinents, les altérations chromosomiques segmentaires (gain ou perte de fragments de chromosomes) et les altérations chromosomiques numériques (gain ou perte de chromosomes entiers), reflétant probablement des mécanismes d'oncogenèse différents. Les tumeurs présentant uniquement des altérations numériques sont des tumeurs de bon pronostic (groupe A sur la figure 9). Elles correspondent aux tumeurs triploïdes, généralement localisées, avec une histologie favorable et sont souvent retrouvées chez des nourrissons. En revanche, la présence d'altérations segmentaires, en présence ou absence d'amplification de N-myc d'autre part, est liée à un pronostic défavorable pour le patient et un risque élevé de rechute (groupe B sur la figure 9). Elles se retrouvent chez des patients avec un âge plus élevé ayant des tumeurs de stade avancé. D'autre part, les tumeurs présentant des altérations segmentaires et une amplification de l'oncogène N-myc sont associées à un pronostic encore plus sombre (Figure 9).



**Figure 9** - Classification des neuroblastomes en fonction du profil génomique et corrélation avec le pronostic des patients.

A. Exemple de profil CGH pour les types A à E, le ratio entre marquage à la Cyanine 5 (marquant l'ADN tumoral) et à la Cyanine 3 (marquant l'ADN normal) est représenté en jaune. Les pertes et gains chromosomiques sont représentés en vert et rouge, respectivement.

B. C. Courbes de corrélation entre la progression sans évènement (progression-free survival (PFS)) et la survie globale (overall survival (OS)). (Janoueix-Lerosey et al., 2009)

Ainsi le profil génomique apparaît comme un facteur pronostique indépendant ajoutant de l'information pronostique aux informations cliniques et va permettre d'adapter la prise en charge thérapeutique en fonction des profils génomiques. La prise en compte d'un profil génomique tumoral (prenant en compte l'ensemble des altérations génétiques observées lors

d'une analyse en CGH-array, plutôt que des marqueurs génétiques isolés) pour la décision thérapeutique, dans le cadre d'études nationales ou internationales est prévue (Normand et al., 2011). Un bénéfice thérapeutique pourrait ainsi être apporté aux patients souffrant de neuroblastome de bas risque et de risque intermédiaire. La présence ou l'absence d'altérations chromosomiques segmentaires dans certaines tumeurs de bas risque pourra conduire respectivement à l'intensification thérapeutique ou à la désescalade de traitement. En revanche, pour les patients atteints de neuroblastome de haut risque la détermination du profil génomique n'apportera certainement pas d'information pronostique supplémentaire et n'aidera pas pour la prise en charge thérapeutique car des altérations chromosomiques segmentaires seront observées chez la grande majorité de ces patients.

Ainsi l'ensemble de ces études basées sur la compréhension du génome des tumeurs permet d'affiner la prédiction du pronostic et les traitements proposés pour certains sous groupes de patients, en se dirigeant vers une prise en charge personnalisée. Globalement, ces techniques permettent également de contribuer à la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.

## **2. Les nouvelles cibles thérapeutiques et thérapies innovantes**

La prise en charge du neuroblastome a été révolutionnée par la découverte de l'amplification de N-myc dans une proportion non négligeable de neuroblastome. En effet, celle-ci a permis de différencier les tumeurs pouvant bénéficier d'une thérapie modérée de ceux devant subir une thérapie intensive. Malheureusement il n'existe pas encore de traitement ciblant spécifiquement l'oncogène N-myc. Actuellement, un défi majeur de la recherche est de découvrir de nouveaux marqueurs tumoraux et de développer des thérapies ciblant spécifiquement ces marqueurs. Beaucoup de facteurs de croissance, de récepteurs ou de molécules de signalisation intracellulaire envisagés comme cibles thérapeutiques potentielles sont aujourd'hui passés au crible (Modak and Cheung, 2010 ; Verissimo et al., 2011). Nous allons détailler l'étude de certaines de ces cibles thérapeutiques faisant l'objet d'évaluation clinique.

Différents récepteurs ont été impliqués dans la pathogénèse du neuroblastome et font actuellement l'objet de travaux translationnels associant recherche préclinique et clinique pour comprendre très précisément leur signalisation et développer des molécules les ciblant spécifiquement.

Le récepteur de neurotrophines TrkB participe à la croissance, la différenciation et l'apoptose des cellules du système nerveux (Nakagawara, 2001). Des taux élevés de cette protéine sont corrélés à un mauvais pronostic (Nakagawara et al., 1994) et à la résistance à la chimiothérapie (Ho et al., 2002) dans le neuroblastome. L'inhibition de cette protéine dans des modèles cellulaires et murins de neuroblastome a montré des résultats satisfaisants (Evans et al., 2001). Actuellement, l'inhibiteur spécifique de ce récepteur (CEP-701) est en cours d'investigation dans un essai clinique de phase I chez des patients atteints de neuroblastome de haut risque (NCT00084422).

L'insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) est impliqué dans la régulation de la prolifération, la survie, la différenciation et la transformation cellulaire (Bähr and Groner, 2005). Cette protéine est hautement exprimée dans les neuroblastomes (El-Badry et al., 1989) et corrèle avec la tumorigénicité et la présence de métastases (van Golen et al., 2006). Les résultats précliniques obtenus *in vitro* et *in vivo* sont satisfaisants pour le neuroblastome (George et al., 2010). L'anticorps monoclonal dirigé contre IGF1R (IMC-A12) est actuellement en cours d'investigation dans les neuroblastomes dans un essai clinique de phase II (NCT00831844).

Le récepteur à activité tyrosine kinase ALK, fait l'objet d'un grand nombre d'études pré-cliniques et cliniques dans différentes tumeurs dont le neuroblastome pour lequel il a été décrit comme oncogène majeur (Chen et al., 2008 ; George et al., 2008 ; Janoueix-Lerosey et al., 2008 ; Mosse et al., 2008). Le rôle de ALK dans la pathogénèse du neuroblastome et les effets de l'inhibition spécifique de cette molécule dans cette tumeur font l'objet d'une partie de cette thèse et seront détaillés plus loin.

D'autre part, des molécules impliquées dans des processus cellulaires aussi variés que l'acétylation de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire, l'angiogénèse ou la signalisation pro-proliférative sont actuellement en cours d'investigation clinique dans le neuroblastome. Les inhibiteurs d'histones désacétylases (HDAC) représentent notamment une classe d'agents thérapeutiques dont l'utilisation semble très intéressante dans les cancers. Pour les neuroblastomes, l'expression de l'isoforme HDAC8 est corrélée aux stades avancés de la maladie (Oehme et al., 2009). De plus, le ciblage spécifique de cette protéine dans des modèles cellulaires de neuroblastome a permis de diminuer la prolifération cellulaire et d'augmenter la différenciation cellulaire. Ainsi l'acide valproïque et le vorinostat (deux

inhibiteurs d'HDAC à spectre d'activité large) sont testés dans les tumeurs neuroblastiques dans des essais cliniques de phase I. D'autre part, un inhibiteur spécifique de l'isoforme HDAC8 (PCI-34051) (Balasubramanian et al., 2008) a été développé et pourrait représenter un traitement plus spécifique intéressant pour les neuroblastomes.

L'angiogénèse joue un rôle primordial dans le neuroblastome, une tumeur solide très vascularisée dont la croissance, l'invasion et la métastatisation requièrent de nombreux vaisseaux sanguins. De plus, cette tumeur est fréquemment associée à des métastases dès le diagnostic. Au cours du processus d'angiogénèse, la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (ou néovascularisation) est médiée par différents acteurs dont des molécules d'adhésion, des enzymes dégradant la matrice ou des facteurs de croissance associés à des récepteurs (Roy Choudhury et al., 2012). Nous citerons ici le couple *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) et *Vascular Endothelial Growth Factor receptors* (VEGFRs) jouant un rôle crucial dans la pathogénèse et la néovascularisation du neuroblastome. VEGF et ses récepteurs sont exprimés dans les neuroblastomes et l'expression du VEGF est associée au cas de neuroblastomes de mauvais pronostic. Différents traitements expérimentaux ciblant le VEGF (Shusterman and Maris, 2005) ont permis d'inhiber la croissance de xénogreffes neuroblastiques. Ceci a donné un rationnel fort pour tester des molécules ciblant le VEGF (bevacizumab, aflibercept and vandetanib) en clinique chez les enfants atteints de cancers et notamment de neuroblastome (NCT00085111, NCT00622414 et NCT00533169).

Le régulateur du cycle cellulaire, Aurora kinase A joue un rôle majeur dans la transition G2/M et son inhibition provoque l'arrêt dans le cycle cellulaire et l'apoptose (Hirota et al., 2003), (George et al., 2010). Cette protéine est sur-exprimée dans différentes tumeurs et notamment le neuroblastome. Après une étude clinique de phase I encourageante (Wagner and Danks, 2009 ; Carol et al., 2011), l'inhibiteur spécifique de cette protéine (MLN8237) est entré en phase II (NCT01154816).

D'autre part l'importance des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR ou encore des MAPK dans le maintien de la croissance et la prolifération cellulaire du neuroblastome (Opel et al., 2007 ; Sartelet et al., 2008 ; Fulda, 2009) a sollicité un intérêt tout particulier pour examiner l'activité anti-tumorale potentielle d'inhibiteurs de ces voies en clinique. De nombreux composés comme la rapamycin, le temsirolimus, l'everolimus ou AP23573 sont actuellement en cours d'investigation en association à d'autres traitements ciblés ou à de la chimiothérapie.

Différentes thérapies présentées ici permettraient également de diminuer les taux de N-myc, notamment les inhibiteurs d'Aurora kinase (Faisal et al., 2011) et les inhibiteurs de mTor (Engelman, 2009). Ceci est particulièrement intéressant puisque nous avons vu qu'il n'existe pas de traitement ciblant directement cet oncogène. Ces traitements pourraient ainsi être particulièrement bénéfiques pour les tumeurs neuroblastiques de haut risque, exprimant très fréquemment N-myc (jusqu'à 40%).

Un enthousiasme initial majeur a accompagné le développement de ces thérapies ciblées, qui par opposition à la thérapie conventionnelle (radiothérapie, chimiothérapie) ne visent qu'une sous population de cellules, pouvant ainsi limiter les effets toxiques. Toutefois, les résultats obtenus sont mitigés car des phénomènes de rechute ou de résistance au traitement ont été rapportés, suggérant l'importance de mécanismes d'échappement (Petrelli and Giordano, 2008 ; Modak and Cheung, 2010). Ainsi, les approches multi-cibles se développent de plus en plus (Espinoza-Fonseca, 2006) et certains modèles confirment qu'une inhibition partielle de plusieurs cibles peut se révéler plus efficace que l'inhibition complète d'une seule cible (Csermely et al., 2005).

De très nombreux exemples de thérapies combinées intéressantes associant plusieurs traitements ciblés ou une thérapie ciblée à des traitements conventionnels peuvent être envisagés, nous en citerons certains.

Des associations thérapeutiques combinant un inhibiteur de tyrosine kinase et une molécule ciblant un ou plusieurs voies de signalisation intracellulaire sont très intéressantes. En effet, la signalisation en aval des récepteurs est souvent très complexe et l'inhibition des voies de signalisation à plusieurs niveaux améliore l'efficacité des traitements. L'inhibition d'IGF1R et de son effecteur d'aval mTOR a montré une cytotoxicité additive dans des cellules de neuroblastome (Coulter et al., 2008).

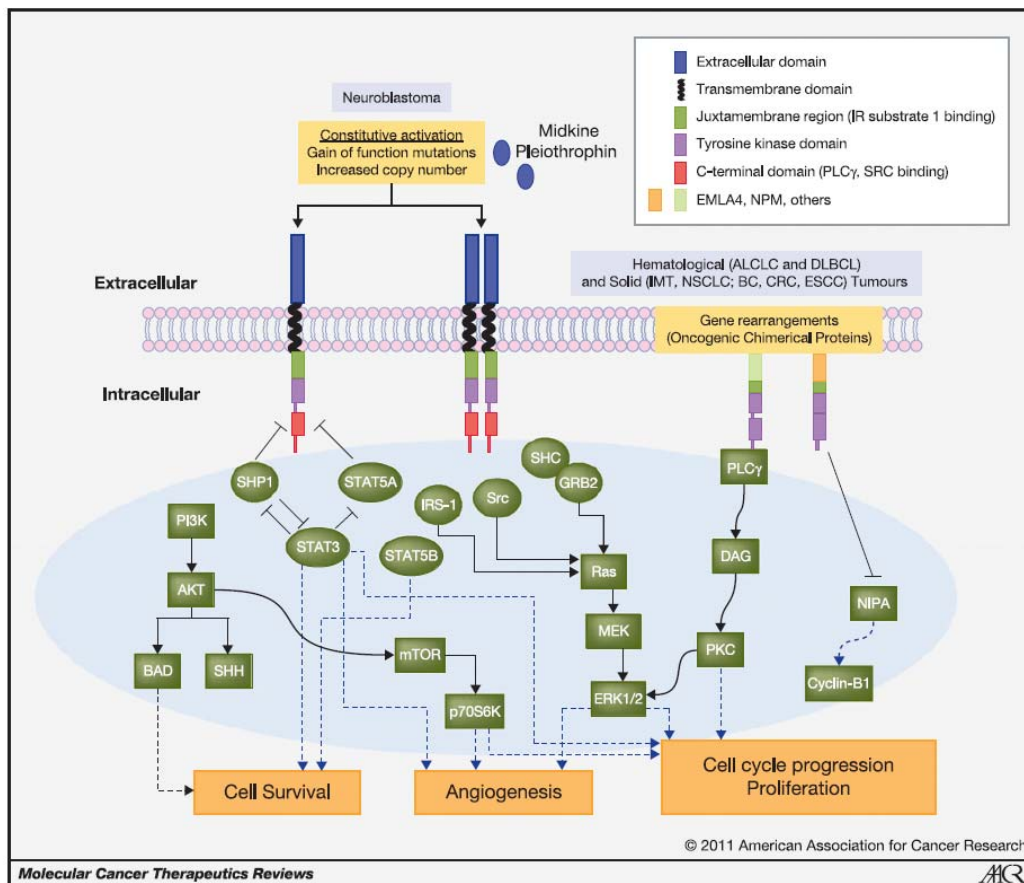
L'utilisation de chimiothérapie à doses faibles en continu (dosage métronomique) permettrait de potentialiser les effets de thérapies anti-angiogéniques. Ce type d'association a un effet cytotoxique sur les cellules tumorales et sur les cellules endothéliales et permet de limiter la prolifération des cellules endothéliales, l'angiogénèse et la croissance tumorale. Ainsi l'association du topotecan (inhibiteur de topoisomérase I qui possède une activité anti-angiogénique à faibles doses) avec différentes thérapies ciblant le VEGF est très efficace et permet de limiter la croissance tumorale et l'angiogénèse dans des modèles expérimentaux de neuroblastome (Kim et al., 2002 ; Kumar et al., 2011).

### **3. Emergence de ALK comme cible thérapeutique du neuroblastome**

Des réarrangements chromosomiques impliquant ALK ont été décrits dans plusieurs cancers. Nous citerons les tumeurs inflammatoires myofibroblastiques, les lymphomes B diffus à grandes cellules, les carcinomes squameux de l'œsophage, les cancers du poumon non à petites cellules et les carcinomes rénaux de façon très récente (Barreca et al., 2011). Concernant les tumeurs du poumon non à petites cellules, la présence de la protéine de fusion EML4-ALK (*echinoderm microtubule-associated protein-like 4*) est détectée dans plus de 10% des cas (Zhang et al., 2010). Elle est associée à une réponse thérapeutique excellente au crizotinib (développé par Pfizer), inhibiteur sélectif des kinases ALK et c-Met, avec des IC50 comprises entre 5 et 20 nM dans un panel de lignées tumorales humaines. Ces valeurs sont 20 fois supérieures pour atteindre l'inhibition d'autres kinases (Christensen et al., 2007 ; Zou et al., 2007). Le crizotinib agit en se fixant dans la poche ATP de l'enzyme ALK, empêchant ainsi la fixation d'ATP et donc la phosphorylation du récepteur. Le développement clinique de cette molécule a été particulièrement rapide dans l'indication précise du cancer du poumon non à petites cellules. Le potentiel tumorigène de la protéine de fusion EML4-ALK a été démontré en 2007 (Soda et al., 2007 ; Rikova et al., 2007) et en 2010 les premiers résultats des études cliniques testant le crizotinib chez des patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules localement avancés présentant un réarrangement du gène ALK ont été publiés (Kwak et al., 2010). La FDA a même accordé un processus accéléré d'acceptation de cette molécule dans les cancers du poumon présentant une altération de ALK. Aujourd'hui plus d'une dizaine d'essais cliniques sont en cours pour évaluer l'efficacité anti-tumorale du crizotinib dans différents cancers, principalement des tumeurs solides de stade avancé.

Concernant le neuroblastome, des travaux initiaux ont montré que l'expression de ALK (en ARNm et en protéine) était très fréquente dans les tissus neuroblastiques mais n'avaient pas pu mettre en évidence de corrélation avec les facteurs pronostiques du neuroblastome (Lamant et al., 2000). Par la suite des amplifications de ALK conduisant à de fort taux d'expression de la protéine ont été identifiées dans les neuroblastomes (Miyake et al., 2002 ; Osajima-Hakomori et al., 2005). Au cours de l'année 2008, ALK a été décrit comme oncogène majeur du neuroblastome. Plusieurs groupes ont rapporté la présence de mutations et d'amplifications de ALK dans environ 10% et 2% des cas de neuroblastome, respectivement. Concernant les mutations activatrices de ALK, elles sont présentes dans la

majorité des cas familiaux mais également dans environ 8% des cas sporadiques de neuroblastome (Chen et al. ; Janoueix-Lerosey et al. ; George et al. ; Mosse et al., 2008 ; De Brouwer et al., 2010). Trois mutations différentes ont été retrouvées au niveau germlinal : R1192P, G1128A et R1275Q, la plus fréquente (Janoueix-Lerosey et al., 2008 ; Mosse et al., 2008). Au niveau sporadique, il a été rapporté que douze résidus pouvaient être affectés par des mutations de ALK. Deux positions de mutation les plus fréquentes (Hot spot) ont été rapportées en R1275 et F1174 (De Brouwer et al., 2010). La majorité des mutations décrites est localisée dans le domaine tyrosine kinase du récepteur et entraîne une activation/phosphorylation constitutive du récepteur et de ses effecteurs d'aval. ALK est capable d'activer un grand nombre de voie de signalisation, principalement AKT, STAT3 et MAPK, formant un réseau de signaux complexes et redondants (Figure 10). L'activation d'AKT va induire principalement la survie cellulaire alors que les voies STAT3 et MAPK sont également impliquées dans la prolifération cellulaire et l'angiogénèse.



**Figure 10-** Représentation de la signalisation du récepteur ALK. (Grande et al., 2011)



La présence d'altérations de ALK (mutation ou amplification) n'apparaît pas comme un facteur pronostique indépendant. Il a été rapporté que les mutations activatrices de ALK sont distribuées de façon similaire entre les différents stades cliniques de la maladie et aucune association entre mutation de ALK et survie des patients atteints de neuroblastome n'a pu être établie (De Brouwer et al., 2010). En revanche, les amplifications de ALK surviennent très majoritairement dans les cas présentant une amplification de N-myc. Ainsi entre 7 et 15 % des cas de neuroblastome amplifiant N-myc présenteraient aussi une amplification de ALK.

Le pouvoir transformant des mutations (particulièrement des mutations les plus fréquentes en R1275 et F1174) a été démontré *in vitro* et leur rôle oncogénique a été évalué *in vivo*. La sur-expression de la protéine ALK mutée *in vitro* accélère la formation de colonie cellulaire en agar mou et induit leur prolifération de façon indépendante à l'Il-3 (Chen et al. ; George et al., 2008). L'injection de cellules portant une mutation de ALK à des souris induit la formation de tumeurs (Chen et al., 2008).

De l'ensemble de ces données est né un intérêt considérable pour mieux définir le rôle de ALK dans la pathogénèse du neuroblastome et développer l'utilisation de thérapies ciblant ALK dans cette pathologie.

L'extinction de ALK par des techniques d'ARN interférence contre ALK a permis de réduire significativement la prolifération cellulaire et d'induire la mort cellulaire *in vitro* (George et al. ; Janoueix-Lerosey et al. ; Mosse et al., 2008). Certaines études ont montré que l'efficacité de ces traitements était meilleure pour les lignées portant une mutation de ALK et plus particulièrement la mutation F1174L (George et al. ; Mosse et al., 2008). Plus récemment des siRNA vectorisés dans des liposomes ont été utilisés *in vivo* dans des modèles neuroblastiques et ont montré une très bonne efficacité thérapeutique, en induisant l'apoptose et en réduisant l'angiogénèse (Di Paolo et al., 2011). Des inhibiteurs pharmacologiques de ALK (crizotinib et TAE684 principalement) ont montré une cytotoxicité importante *in vitro* sur des lignées exprimant ALK sauvage ou muté, avec une efficacité supérieure pour les lignées portant la mutation R1275Q. En revanche, *in vivo* l'efficacité de ces traitements a été obtenue uniquement sur un sous-type de neuroblastome : les xénogreffes portant une amplification de ALK ou la mutation R1275Q. Une absence d'efficacité a été observée sur les xénogreffes exprimant une forme sauvage de ALK ou la mutation F1174L (Bresler et al., 2011 et Regairaz et al, en cours de publication). Actuellement, le crizotinib est en cours de développement

clinique dans les tumeurs pédiatriques et notamment les neuroblastomes à haut risque (en rechute ou réfractaires à la chimiothérapie) (NCT00939770). Un des objectifs de cet essai est d'examiner la relation entre réponse au crizotinib et statut génique de ALK.

Des anticorps monoclonaux dirigés contre ALK utilisés seuls ou en combinaison avec le crizotinib ont également montré un effet cytotoxique intéressant *in vitro* (Carpenter et al., 2012). L'utilisation de tels outils a également permis de décortiquer la mécanistique associée à la voie de signalisation ALK. Ainsi les travaux publiés par Mazot et al., en 2011 et 2012 présentent une caractérisation très fine de la localisation cellulaire, de la dégradation, du niveau de maturation et d'activation des formes sauvages et mutées du récepteur ALK. Il a pu être démontré que l'état de maturation du récepteur était déterminant dans le contrôle de sa localisation cellulaire et dans la régulation de son niveau de phosphorylation. Ces études rapportent notamment que les formes mutées du récepteur sont majoritairement retenues au niveau intracellulaire (dans le golgi et le réticulum endoplasmique) et que le pool intracellulaire est faiblement phosphorylé. Ceci est lié à un défaut de maturation (par N-glycosylation). De façon intéressante, l'utilisation d'anticorps monoclonaux agonistes ou antagonistes de ALK permet de réguler le trafic intracellulaire, la dégradation du récepteur et son niveau d'activation.

Finalement, le rôle exact de ALK et phospho-ALK dans la progression du neuroblastome reste tout de même flou. Il est important de rappeler que la grande majorité des tumeurs neuroblastiques expriment ALK sous sa forme sauvage (les mutations de ALK sont détectées dans 10% des cas environ). Ainsi beaucoup de travaux actuels tentent de mieux caractériser les mécanismes de régulation et les voies de signalisation associés au récepteur ALK sous sa forme sauvage.

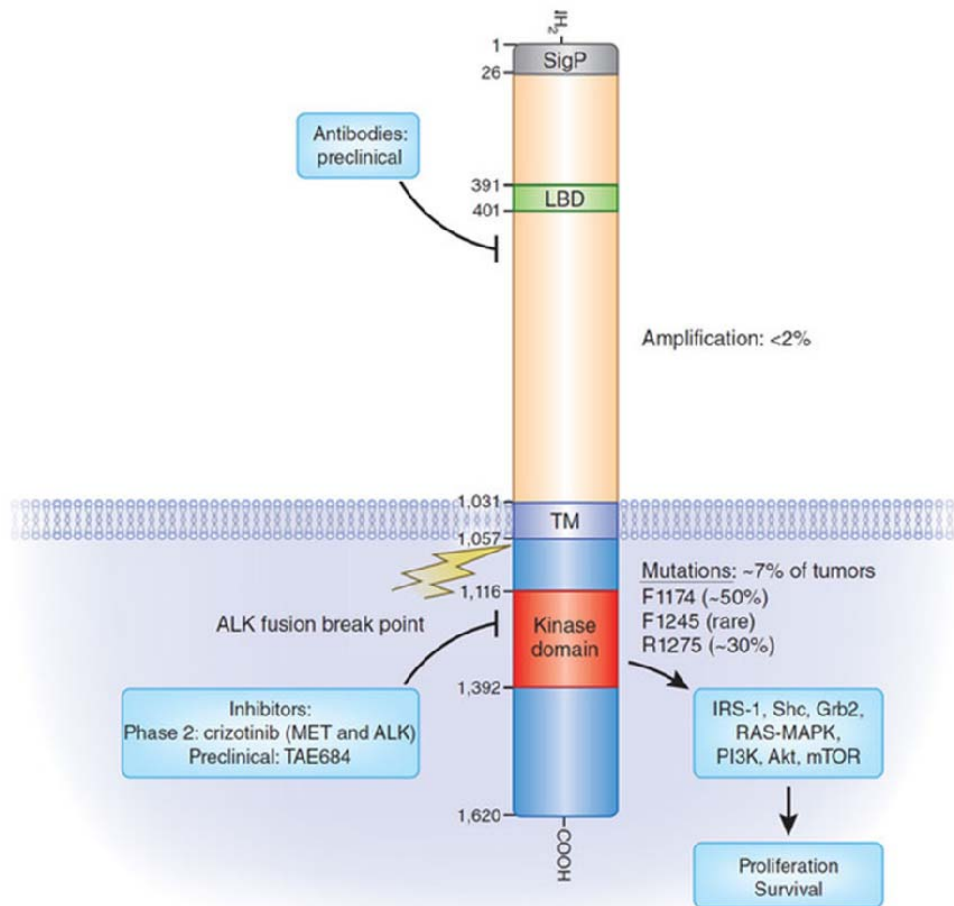
Il est intéressant de noter qu'en 2006 il avait été identifié que ALK appartenait à la famille des récepteurs à dépendance. En absence d'activation, le récepteur est clivé, exerçant ainsi une activité pro-apoptotique. En revanche lorsqu'il est activé, il délivre des signaux de survie cellulaire (Mourali et al., 2006). Ces données révèlent un rôle d'ALK en dehors de sa phosphorylation et un mécanisme de régulation de mort cellulaire très intéressant, exercé par le récepteur ALK lui-même, qui pourrait être exploité dans une perspective thérapeutique.

En plus de nos travaux, différentes études (revues par Mossé et al., 2009) ont révélé la présence de fort taux d'expression et d'activation de ALK ainsi que de ces effecteurs d'aval

en absence de mutation de ALK. Plus particulièrement, les travaux de Passoni et al., 2009 montrent que la forme sauvage du récepteur ALK possède un pouvoir oncogénique. Cette équipe a également démontré que des taux élevés d'ARNm codant pour ALK sont corrélés à un mauvais pronostic. D'autre part, les données de Schulte et al., 2010 révèlent que les neuroblastomes exprimant fortement ALK sous forme sauvage présentent un phénotype clinique et moléculaire similaire aux tumeurs exprimant un récepteur ALK muté. Les travaux de Reiff et al., 2011 illustrent aussi le rôle essentiel de ALK sauvage (ou muté) dans la prédisposition au neuroblastome, en démontrant que l'activation de ALK par son ligand midkine (MDK) dans des neurones sympathiques entraîne une stimulation de deux régulateurs clé de la prolifération du neuroblastome : N-myc et TrkB.

D'après toutes ces données la protéine ALK apparaît comme une cible thérapeutique intéressante complémentaire de phospho-ALK.

Le récepteur ALK est une protéine à activité tyrosine kinase et possède classiquement un domaine intracellulaire, incluant le domaine tyrosine kinase, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire, comportant un domaine de fixation des ligands (Figure 11).



**Figure 11** – Structure du récepteur à tyrosine kinase ALK. LBD (Ligand binding Domain) est le domaine de liaison des ligands et TM la partie Transmembranaire. (Adapté de Wellstein and Toretsky, 2011)

Ces résultats sont controversés mais deux protéines semblent capables de se fixer sur ce récepteur, la pléiotrophine (PTN) et MDK (Stoica et al., 2001 et 2002). Ces deux protéines présentant 50% d'homologie en termes de séquence en acides aminés. Elles possèdent des fonctions communes et variées. Notamment au cours de l'embryogénèse, elles participent au développement du système nerveux et stimulent la différenciation et la survie neuronale. Elles induisent également la croissance tumorale (revu par Kadomatsu and Muramatsu, 2004 et Kadomatsu, 2005). De façon intéressante, leur signalisation passe par des récepteurs communs, notamment (ALK, syndecan 3 (SDC3)) ou le récepteur protein tyrosine phosphatase type B, Z (RPTPβ/ζ). Hormis dans le système nerveux, l'expression de ces protéines est faible dans les tissus sains adultes. En revanche, PTN et MDK sont fréquemment exprimées dans les tissus cancéreux. Entre autres, PTN est exprimée dans les cancers du sein (Wellstein et al., 1992), de la prostate (Vacherot et al., 1999), du poumon (Jäger et al., 1997)

et les glioblastomes (Grzelinski et al., 2005). Pour MDK, nous citerons les cancers de la prostate (Konishi et al., 1999), du pancréas (Maeda et al., 2007) de la vessie (O'Brien et al., 1996), de l'utérus (Tanabe et al., 2008) ou encore les ostéosarcomes (Maehara et al., 2007) . L'expression de ces deux protéines est retrouvée dans les tumeurs neuroblastiques et corrèle avec des pronostics opposés. MDK est associée aux cas de mauvais pronostic alors que PTN est plus exprimée dans les cas de bon pronostic (Nakagawara et al., 1995), soulignant certainement des fonctions différentes de ces deux protéines dans la pathogénèse des neuroblastomes et renforçant un intérêt tout particulier pour explorer les fonctions de MDK dans cette pathologie. MDK a déjà été proposée comme cible thérapeutique de différentes tumeurs (Muramatsu, 2010) mais son implication précise dans l'initiation et la progression des neuroblastomes est mal connue.

## Partie . 2 LES INHIBITEURS DE TOPOISOMÉRASE I

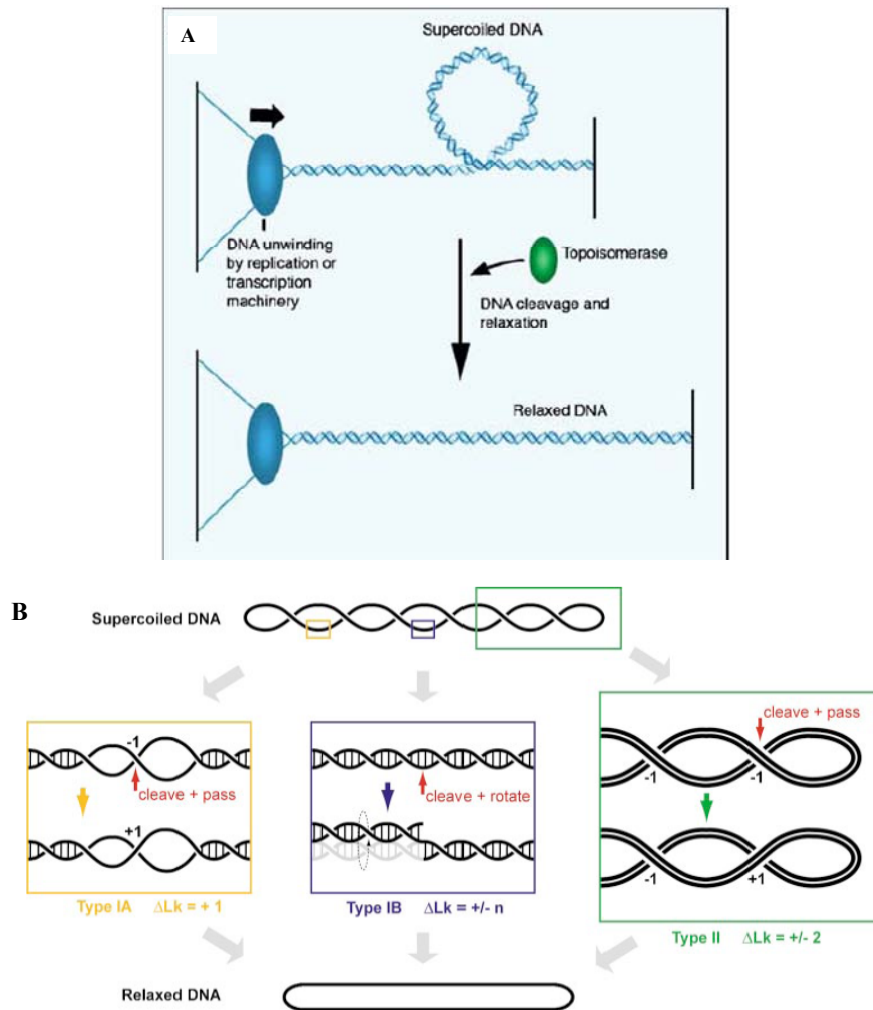
### I. Les ADN topoisomérases

Les ADN topoisomérases sont des enzymes qui régulent le stress topologique ou le degré d'enroulement de l'ADN au cours de processus fondamentaux comme la réplication, la transcription, la recombinaison, la réparation ou la condensation chromatinienne. Pour l'ensemble de ces étapes fondamentales au métabolisme d'une cellule, un accès à l'information génétique est indispensable. L'information génétique est compactée très finement dans les chromosomes constitués d'ADN, structuré en double-hélice et associé à des protéines (notamment les histones). Il s'agit donc d'une entité fortement enchevêtrée présentant un grand nombre de contraintes topologiques. En plus d'être très compactées, les hélices d'ADN sont fixées en leurs extrémités sur la matrice nucléaire, compliquant ainsi l'accessibilité aux bases de l'ADN. Au cours du métabolisme de l'ADN, il est indispensable que la double-hélice soit ouverte de façon temporaire, les brins d'ADN servant ainsi de matrice. Ceci introduit des contraintes physiques supplémentaires en amont (super-tours positifs) et en aval (super-tours négatifs) de l'ouverture. Ainsi, des régulations topologiques de l'ADN sont indispensables au maintien de la structure de l'ADN ainsi qu'à l'optimisation des processus cellulaires impliquant l'ADN, vitaux pour les cellules. Les ADN topoisomérases interviennent à ce niveau pour relaxer l'ADN et éliminer les surenroulements. Chez l'homme, il existe six topoisomérases, deux sous-familles I et II et deux membres dans chaque sous-familles (Table 4). Il existe un type IIB, décrit par Bergerat et al., 1994 retrouvé uniquement chez les Archaeobactérie.

Enzyme	Type	Cellular roles
Topoisomerase I	IB	Replication, transcription, chromatin remodeling
mtTopoisomerase I	IB	Mitochondrial replication, transcription
Topoisomerase II $\alpha,\beta$	IIA	Replication, chromosome segregation
Topoisomerase III $\alpha,\beta$	IA	Recombination, repair

**Table 4** – Les ADN topoisomérases chez l'homme (Leppard and Champoux, 2005)

En fonction de leur sous-famille d'appartenance, type I ou II, les ADN topoisomérases agissent en insérant une coupure transitoire dans un des brins (type I) ou dans les deux brins d'ADN (type II) (Figure 12).



**Figure 12** – Mode d’action des différentes sous-familles de topoisomérases.

A. Super-tours dans l’ADN induits par les machineries cellulaires et relaxés par la topoisomérase. B. Le type IA coupe un des deux brins d’ADN et catalysent ensuite le passage de l’autre brin à travers cette coupure. Ainsi, le numéro d’enlacements (L) change seulement d’une unité par cycle. Les topoisomérases IB, coupent aussi un seul brin d’ADN, mais elles permettent une ou plusieurs rotations du duplexe autour de la liaison phosphodiester qui reste intacte sur le brin complémentaire. De cette façon le nombre d’enlacement peut être altéré de plusieurs unités par cycle. Les topoisomérases de type IIA, utilisent l’ATP afin de transporter un duplexe à travers la coupure double-brin générée sur un autre duplexe (inter- ou intramoléculaire). Elles peuvent ainsi changer le nombre d’enlacement de +/- 2 unités (Corbett and Berger, 2004).

Pour le type I, nous mentionnerons une autre division en type IA, découvert par Wang en 1971 ou IB découvert par Champoux et Dulbecco, en 1972. Cette classification est basée sur la capacité des enzymes à se fixer et introduire la cassure sur un phosphate en 5’ (type IA) ou 3’ (type IB) du fragment d’ADN. Les topoisomérases de type II, isolées pour la première fois par Gellert et al., en 1976, comme les topoisomérases IA, catalysent la formation d’une

liaison avec le phosphate en position 5, mais sur les deux brins d'ADN. Des caractéristiques structurales mais aussi la dépendance ou non à une source d'énergie pour effectuer leur action ou encore le caractère positif ou négatif des surenroulements relaxés sont autant de critères qui différencient les topoisomérases. Les enzymes de type I sont capables de relaxer les super-tours négatifs et positifs alors que les enzymes de type II ( $2\alpha$ ) relaxent plus facilement des super-tours positifs. D'autre part, le mode de rotation autour du site de clivage est différent en fonction des enzymes. Les enzymes de classe IA permettent une rotation du brin intact autour du brin clivé en empruntant le site de clivage. Les enzymes de type IB induisent une rotation « contrôlée » de la double-hélice à distance du site de clivage. Enfin, les enzymes de type II permettront une rotation des deux brins d'ADN autour du site de cassure.

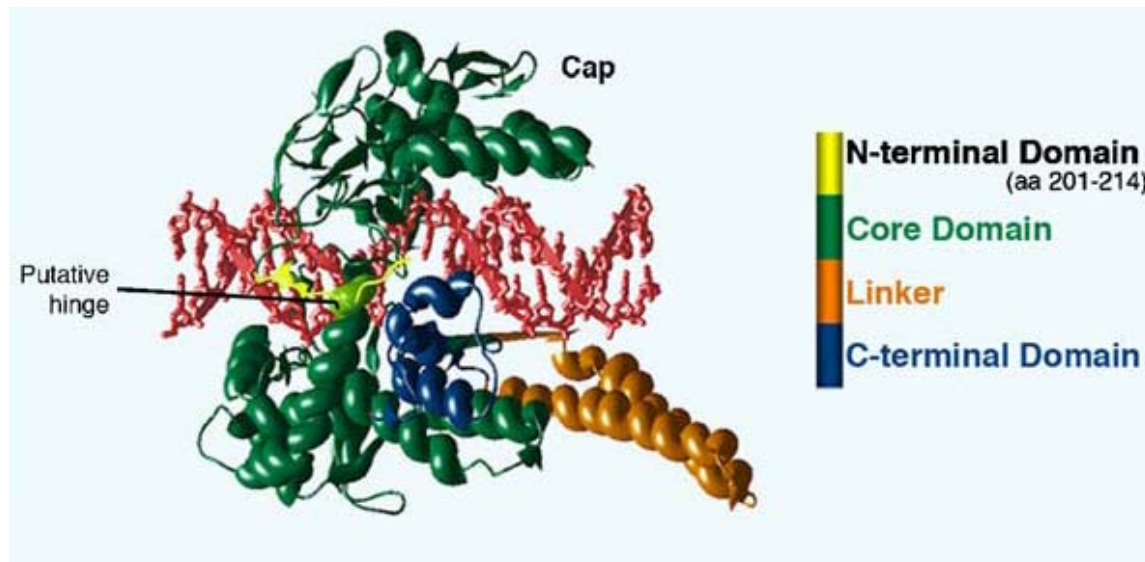
Chez les mammifères, ces enzymes sont codées par 6 gènes différents : TOP1, TOP1mt, TOP2 $\alpha$ , TOP2 $\beta$ , TOP3 $\alpha$  et TOP3 (Pommier, 2009). En accord avec leur rôle dans la cellule, la localisation de ces enzymes est majoritairement nucléaire. De plus, la topoisomérase I a un rôle primordial dans la synthèse des ARN ribosomiaux, expliquant sa localisation privilégiée dans le nucléole. De plus, une topoisomérase mitochondriale (TOP1mt) a été identifiée en 1979 (Fairfield et al., 1979) et mieux caractérisée de façon plus récente (Zhang et al., 2001). Dans la suite du manuscrit, nous nous intéresserons exclusivement à l'ADN topoisomérase I humaine (appartenant au type IB) au cœur du travail mené durant la thèse. Elle sera désignée ADN topoisomérase I ou topoisomérase I.

## **1. L'ADN topoisomérase I**

### **a. Structure**

La topoisomérase I est une protéine de 91 kDa (765 amino acids (a.a)), divisée en 4 domaines : le domaine N-terminal (allant des a.a. 1 à 214), le domaine central (des a.a. 215 à 635), le domaine de jonction (des a.a. 636 à 712) et le domaine C-terminal. (Figure 13) (Leppard and Champoux, 2005).





**Figure 13** – Structures linéaire et tridimensionnelle de l’ADN topoisomérase I humaine (Leppard and Champoux, 2005).

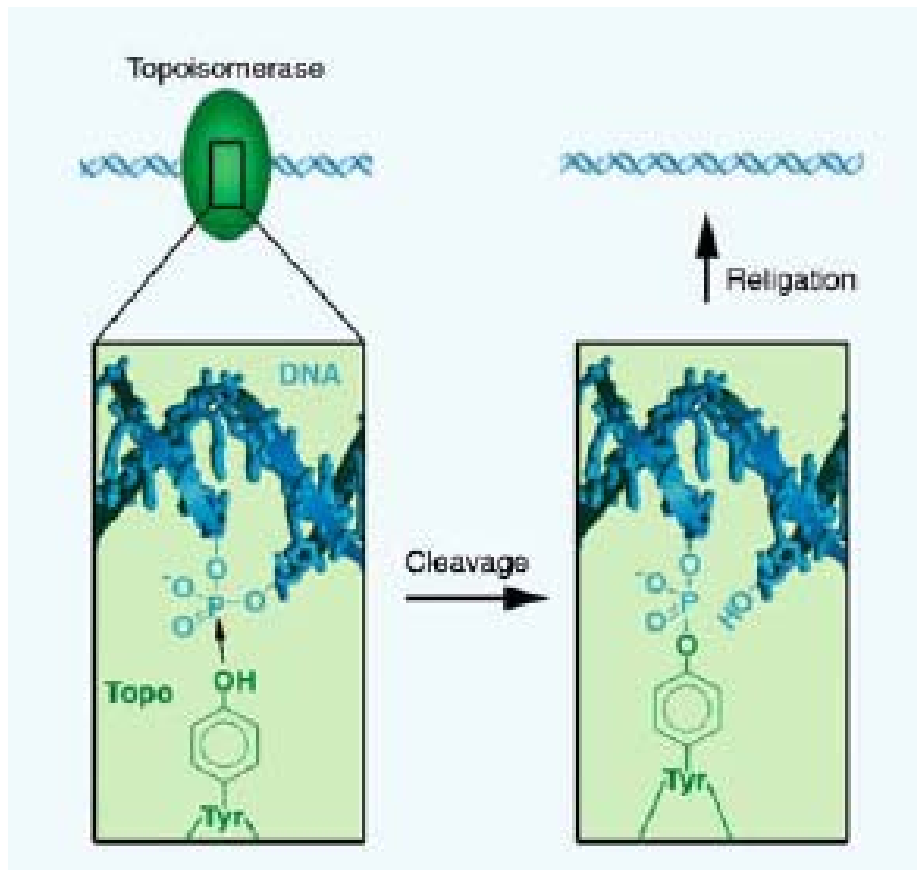
Le domaine de jonction (ou linker) permet de connecter le domaine C-terminal au domaine central. Le domaine C-terminal contient le site actif (couvrant les a.a. 713 à 765) avec en particulier 5 résidus jouant un rôle majeur dans l’activité de l’enzyme : Arg-488, Lys-532, Arg-590, His-632 et Tyr-723 (Redinbo et al., 2000 ; Champoux, 2001 ; Interthal et al., 2004). Le résidu tyrosine en position 723 est particulièrement important car il permet l’attaque nucléophile du phosphate sur l’ADN, étape initiatrice de la liaison entre l’ADN et la topoisomérase I. Les 4 autres résidus du site actif préparent entre autre, cette attaque en positionnant correctement le phosphate.

La structure cristallographique de la topoisomérase I a été publiée par Stewart et al., en 1998. Elle a permis de montrer que l’enzyme pouvait s’insérer parfaitement dans la double-hélice d’ADN et qu’elle s’y fixait à l’image d’une pince double (Champoux, 2001). Le domaine central et le domaine C-terminal sont indispensables à l’activité enzymatique *in vitro* (Stewart et al., 1997). Ces deux domaines, très conservés au sein des eucaryotes sont indispensables à la relaxation de l’ADN (Stewart et al., 1997 ; Redinbo et al., 2000 ). Le domaine N-terminal

et le domaine de liaison sont peu conservés et non primordiaux à l'activité de l'enzyme *in vitro*. En revanche, le domaine N-terminal contient des acides aminés responsables de l'adressage de cette protéine au noyau et au nucléole (Alsner et al., 1992 ; Mo et al., 2000). Différents travaux ont également proposé un rôle de la région de jonction et du domaine N-terminal dans le processus de rotation de l'ADN et dans la régulation de la position ouverte ou fermée de la « pince » de l'enzyme (Leppard and Champoux, 2005).

## **b. Mécanisme d'action, interaction avec l'ADN**

La topoisomérase I peut relaxer aussi bien les surenroulements négatifs que positifs. La liaison s'effectue à l'extrémité 3' de l'ADN et ne nécessite ni énergie, ni ions métalliques. Après ouverture de la double-hélice, c'est la tension présente dans l'ADN qui induira la rotation du fragment d'ADN en aval du site de clivage. La capacité de l'enzyme à se fixer intimement autour de l'ADN résulte de plusieurs interactions ADN-protéine tout le long du fragment d'ADN. La plupart de ces interactions se concentrent autour du site de clivage. Il est défini que celui-ci intervient entre les nucléotides -1 et +1 et que les principales interactions ADN/protéines se concentrent 5 paires de base avant le site de clivage (de -5 à -1). De plus, l'enzyme se fixera préférentiellement sur les séquences d'ADN suivantes : 5-(A/T) (G/C) (A/T) (T)-3' situées entre les positions -4 et -1 (Leppard and Champoux, 2005). Le cycle catalytique de la topoisomérase I se compose de trois phases : la fixation de l'enzyme conduisant au clivage de l'ADN, la relaxation puis la religation de l'ADN, au cours de laquelle l'enzyme pourra se détacher de l'ADN. La liaison établie entre l'ADN et l'enzyme est une liaison covalente qui fait intervenir préférentiellement un résidu thymine en position -1 (Bonven et al., 1985 ; Tanizawa et al., 1993). Un résidu cytosine, toujours en position -1 peut aussi être impliqué dans la liaison. Au niveau de l'enzyme, le résidu tyrosine 723 du site actif réalise l'attaque nucléophile du pont phosphodiester d'une base d'ADN, conduisant à l'ouverture d'un des deux brins d'ADN (Figure 14).



**Figure 14** – Cycle catalytique de l’ADN topoisomérase I humaine, en trois étapes : 1) l’enzyme se fixe sur l’ADN et réalise une attaque nucléophile conduisant au clivage de l’ADN, 2) l’ADN sera ensuite relaxé et 3) religué. L’enzyme pourra alors se dissocier de l’ADN (Leppard and Champoux, 2005).

La stabilisation transitoire de cette liaison fait intervenir le site actif de l’enzyme et un atome d’oxygène à l’extrémité 3’ de l’ADN (Redinbo et al., 2000). A cette étape, l’enzyme forme un complexe avec l’ADN, que l’on appelle le « complexe de clivage ». Pendant ce temps, le mécanisme de relaxation a lieu. Dans le cas de la topoisomérase I humaine, le duplex d’ADN intact se met en rotation à distance du site de coupure. Ceci entraîne la rotation de l’extrémité du brin clivé au sein du site de clivage. Il s’agit d’une « rotation contrôlée » décrite par Stewart et al., en 1998. Elle est illustrée par la figure 14. Une fois l’étape de relaxation terminée, l’ADN sera religué, au cours d’une étape qui est vue comme l’inverse exact de l’étape de coupure. Cette fois, l’attaque nucléophile est réalisée par l’oxygène en 5’ du brin clivé sur le phosphate de l’enzyme. Ceci permet à l’enzyme de se détacher de l’ADN.

A l'état physiologique, l'équilibre entre clivage et ligation est en faveur de la ligation, ce qui limite le nombre de complexes de clivage pouvant être détecté à un instant donné.

### **c. Fonctions de la topoisomérase I**

La topoisomérase I est une enzyme ubiquitaire et essentielle chez les mammifères, les souris K.O (Knock-out) pour ce gène meurent très tôt au cours de l'embryogénèse (Morham et al., 1996). On trouve la topoisomérase I principalement dans le noyau et une grande quantité de l'enzyme s'accumule dans une sous-structure nucléaire, le nucléole. En rapport avec ces deux localisations, de multiples fonctions de la topoisomérase I ont été décrites. Elle permettra notamment de résoudre les tensions topologiques créées lors de phénomènes comme la réparation de l'ADN, la recombinaison, la transcription ou la réplication (Wang and Droge, 1996 ; Champoux, 2001). En effet, l'avancée des fourches de réplication et des machineries de transcription crée des modifications topologiques majeures. De plus, l'implication de la topoisomérase I dans la condensation de la chromatine a été proposée (Castano et al., 1996). Dans le nucléole, l'enzyme est impliquée dans des processus associés aux ARN ribosomiaux (ARNr).

## **2. La topoisomérase I comme cible thérapeutique**

Un grand nombre de médicaments ciblant la topoisomérase I ont été identifiés et sont aujourd'hui largement utilisés en clinique, plus particulièrement en cancérologie et en microbiologie.

En générant la formation de complexes covalents avec l'ADN et en créant des cassures des brins de l'ADN, les topoisomérases I peuvent avoir un rôle toxique majeur dans les cellules (Champoux, 2001). De façon physiologique, les complexes de clivage sont réversibles et ont une durée de vie courte, ils sont ainsi tolérés par les cellules. En revanche, les molécules ciblant les topoisomérases I se lient à l'enzyme lorsque celle-ci est fixée sur l'ADN. Ceci prolonge considérablement la durée de vie des complexes de clivage en empêchant l'étape de religation de la cassure simple-brin introduite dans l'ADN. Ils ne sont pas dangereux en l'état pour la cellule, mais le deviendront lorsque des protéines ou complexes protéiques comme des polymérases, des hélicases ou les machineries de réplication ou de transcription entrent en collision avec les complexes de clivage stabilisés. Ceux-ci seront alors convertis en cassures

double-brin de l'ADN, hautement létales pour les cellules. Dans la suite du manuscrit, nous nous concentrerons exclusivement sur les inhibiteurs de topoisomérase I utilisés en cancérologie. Parmi les inhibiteurs de topoisomérase I utilisés comme antibiotiques, nous citerons les fluoroquinolones, très largement utilisées en clinique. Ils ciblent la topoisomérase bactérienne (Gellert, 1981).

## **II. Les inhibiteurs de topoisomérase I**

### **1. Les différentes classes d'inhibiteurs**

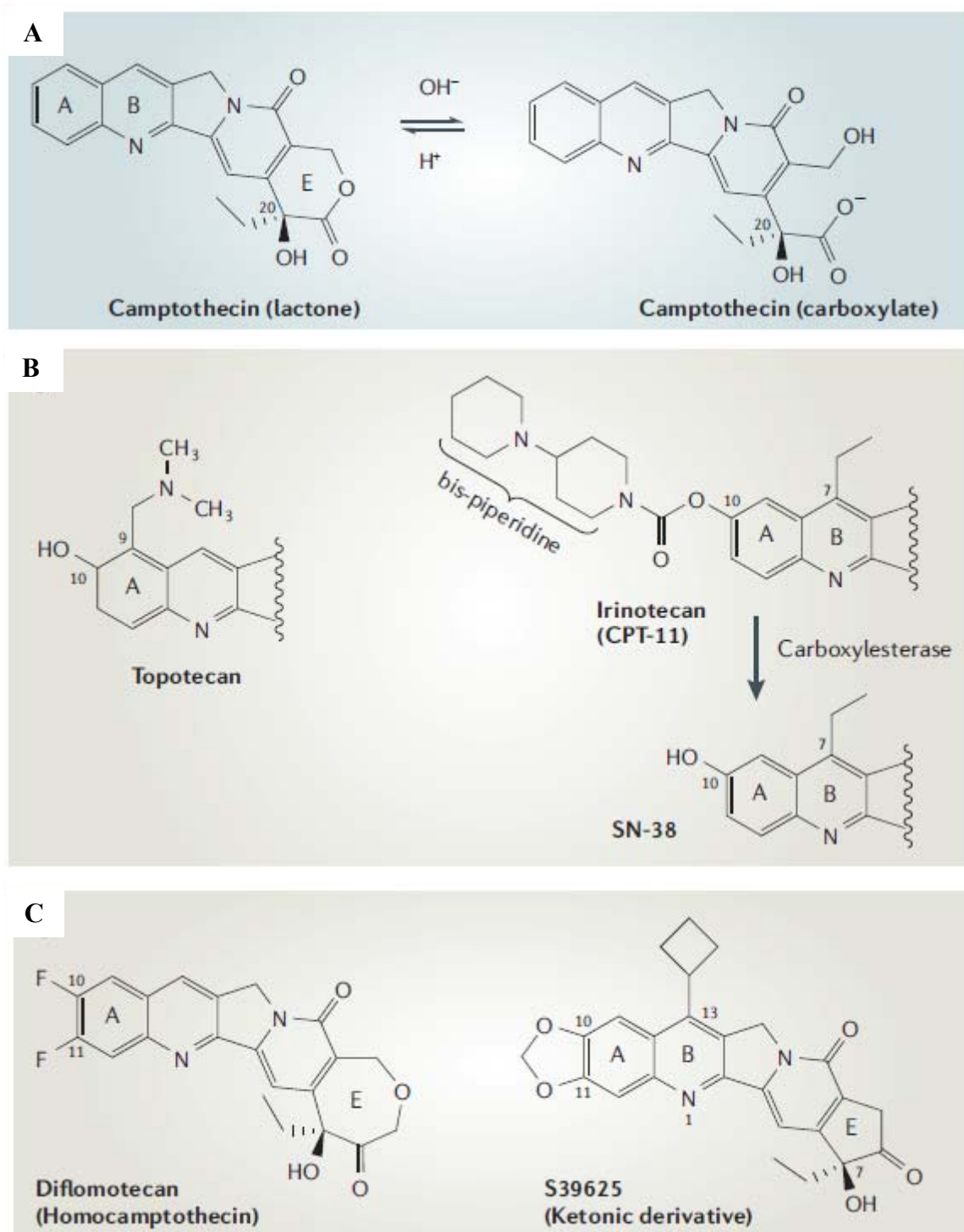
#### **a. Les camptothécines**

La Camptothécine est un alcaloïde naturel, isolé par Wani et Wall à partir de l'écorce d'un arbre chinois, *Camptotheca acuminata* en 1966. Cette molécule a rapidement démontré des propriétés anti-cancéreuses après administration chez des patients dans les années 1970. Malheureusement, son utilisation a été interrompue à cause d'une faible hydrosolubilité et d'effets secondaires associés, en particuliers des cystites hémorragiques (Wall and Wani, 1995). En revanche, l'intérêt pour cette classe de molécules a été relancé après avoir découvert que la topoisomérase I était la cible cellulaire unique de la camptothécine. Notamment, des travaux effectués sur des levures ont démontré qu'une déplétion en topoisomérase I conférait une résistance à la camptothécine (Nitiss and Wang, 1988). De même, des mutations dans le gène de la topoisomérase I, retrouvées dans des lignées cellulaires humaines confèrent une résistance à l'irinotecan (Kubota et al., 1992). Enfin, il a été démontré que l'activité cytotoxique de la camptothécine était corrélée de façon positive au niveau cellulaire de topoisomérase (Burgess et al., 2008).

Des dérivés structuraux de la camptothécine, plus hydrosolubles, moins toxiques ont été synthétisés. Deux molécules aujourd'hui incontournables dans l'arsenal thérapeutique de l'oncologie ont connu un développement en clinique : le topotecan (Hycamtin<sup>®</sup>) et l'irinotecan ou CPT-11 (Campto<sup>®</sup>). Le topotecan a reçu une autorisation de mise sur le marché (A.M.M) pour le traitement du cancer de l'ovaire métastatique en deuxième ligne de traitement (au minimum) et du cancer du poumon non à petites cellules, en monothérapie et en cas de rechute. L'irinotecan possède une A.M.M dans le traitement du cancer colorectal avancé, en première ligne thérapeutique, en combinaison avec les fluoropyrimidines ou en monothérapie après échec d'une chimiothérapie à base de 5-fluoro-uracile. Des résultats

encourageants ont également prouvé l'intérêt de l'irinotecan dans le traitement d'autres tumeurs solides.

Le CPT-11 est une prodrogue, convertie en métabolite actif, 7-éthyl-10-hydroxycamptothécine (SN-38), 100 à 1000 fois plus cytotoxique que le CPT-11. Cette métabolisation est réalisée par les carboxylesterases plasmatiques et cellulaires (Figure 15 B).



**Figure 15** – Structure chimique de la camptothécine et de ses dérivés.

A. Camptothécine sous ses deux formes : forme  $\alpha$ -hydroxylactone, active mais instable à pH physiologique et forme carboxylate inactive et séquestrée par l'albumine sérique.

B. Topotecan et irinotecan, les deux dérivés hydrosolubles de la camptothécine approuvés par la FDA (Food and Drug Administration). La molécule d'irinotecan doit être hydrolysée par les carboxylestérases, pour donner el métabolite actif, le SN-38.

D. Molécules dérivées de la camptothécine possédant des modifications chimiques pour stabiliser le cycle E. (Pommier, 2006).

D'autres molécules de cette classe comme le belotecan ou le gimatecan sont bien avancés dans leur développement clinique et ont démontré une activité intéressante contre les gliomes (Pommier, 2009). Même si le topotecan et l'irinotecan sont les seules molécules approuvées par la FDA et l'EMA et prescrites en clinique (Table 5), plus d'une soixantaine d'inhibiteurs de structures et d'origines différentes est recensée.

Compound	Chemical class	Multi-drug resistance substrate	Clinical trial status	Dose limiting toxicity
Topotecan	Camptothecin	Yes	Approved ovarian ca small cell lung ca	Neutropenia
Irinotecan	Camptothecin	Yes	Approved colorectal ca	Diarrhea, neutropenia
Diflomotecan	Homocamptothecin	No	Phase II	Neutropenia
Gimatecan	Camptothecin	No	Phase II	Thrombocytopenia
Edotecarin	Indolocarbazole	Yes	Phase II	Neutropenia, granulocytopenia
NSC-725776	Indenoisoquinoline	?	Phase I	?
ARC-111	Dibenzonaphthyridinone	No	Preclinical	?

**Table 5** - Caractéristiques chimiques et cliniques d'inhibiteurs de topoisomérase I de différentes classes (Adapté de Teicher, 2008).

L'intérêt d'identifier et de synthétiser de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I a été motivé par les mauvaises caractéristiques pharmacocinétiques des molécules dérivées de la camptothécine, notamment leur métabolisme complexe et leur demi-vie faible. La camptothécine et ses dérivés structuraux sont des molécules pentacycliques qui possèdent un groupe lactone porté par le cycle E (Figure 15A). Cette structure est primordiale pour l'activité des molécules puisque l'attaque hydrophile de l'ADN se fera à partir du groupement hydroxyl du cycle E. En revanche, la fonction lactone est instable à pH physiologique et sera convertie en groupement hydroxylate, conduisant à l'ouverture du cycle E et rendant ainsi la molécule inactive et avide de fixation sur l'albumine plasmatique (Burke and Mi, 1994). Cette instabilité réduit considérablement le temps de contact entre la molécule et la topoisomérase I. Or, un temps de contact prolongé est primordial pour l'efficacité des inhibiteurs de topoisomérase I. Ceux-ci se fixent sur la topoisomérase I, déjà liée à l'ADN. En d'autres termes, ils se lient aux complexes de clivage et les stabilisent. L'efficacité du traitement sera meilleure dès lors que la stabilisation des complexes sera fréquente et assez longue pour permettre la conversion en cassures double-brin de l'ADN. Différentes stratégies ont été adoptées pour améliorer la stabilité plasmatique des inhibiteurs de topoisomérase I et pour stabiliser la forme lactone. Les modifications dans le cycle E de la molécule permettent en



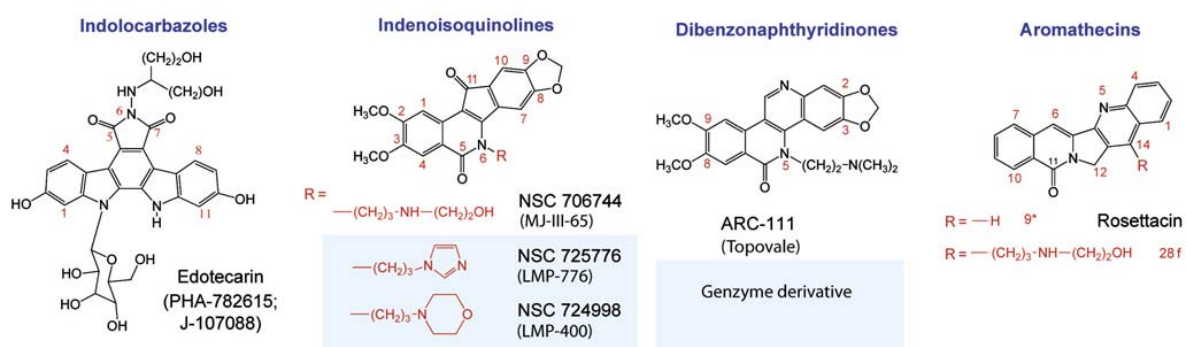
général de stabiliser la forme lactone alors que l'incorporation de groupements lipophiles en positions 7, 9, 10 et 11 réduit l'affinité de liaison de la forme carboxylate (Lansiaux and Bailly, 2003).

Une classe d'analogues structuraux de la camptothécine, récemment développés, les « homocamptothécines » portent des modifications structurales visant à allonger la stabilité et le temps de contact entre l'inhibiteur et les complexes de clivage, en insérant des modifications sur le cycle E (Lavergne et al., 1998). Le diflomotecan (BN80915) possède un groupement méthylène qui stabilise le groupe lactone (Figure 15C). Cette molécule est actuellement en essai clinique de phase II (Table 5) (Kroep and Gelderblom, 2009). Une autre alternative a été de retirer l'oxygène de la fonction lactone du cycle E, ceci empêche l'ouverture du cycle. Le cyclobutane methylenedioxy (S39625) répond à ces caractéristiques. Il est entré récemment en essais cliniques, après un développement préclinique prometteur (Lansiaux and Bailly, 2003 ; Takagi et al., 2007).

En parallèle des dérivés structuraux de la camptothécine modifiés chimiquement, des inhibiteurs de topoisomérase I appartenant à d'autres classes thérapeutiques ont été identifiés.

## b. Les indolocarbazoles

Ce sont les inhibiteurs de topoisomérase I, non dérivés de la camptothécine présentant l'état d'avancement le plus prometteur en clinique (Phases I et II et III) (Table 5). L'Edotecarin est le représentant majeur de cette famille (Figure 16).



**Figure 16** – Inhibiteurs de topoisomérase I non dérivés de la camptothécine (Pommier et al., 2010).

Malgré leur devenir prometteur en clinique, il a été démontré que ces molécules n'étaient pas des inhibiteurs de topoisomérase I purs. Ils ciblent d'autres mécanismes et seraient capables notamment de s'insérer dans l'ADN et d'inhiber certaines Tyrosine Kinase (Martiny-Baron et al., 1993 ; Teicher, 2008).

### **c. Les indenoisoquinolines et les aromathécines**

Les molécules de ces deux familles partagent des caractéristiques structurales et pharmacocinétiques. Étant dépourvues du cycle E, elles sont chimiquement stables contrairement aux dérivés structuraux de la camptothécine. De plus, la stabilisation des complexes de clivage induite par ces composés est prolongée. Ceci permet de réduire la durée de chaque administration et d'améliorer ainsi le confort du patient. Les durées de perfusion des dérivés de la camptothécine sont souvent très longues.

Aussi, ces composés stabilisent des complexes de clivage situés sur des séquences d'ADN différentes de celles ciblées par les dérivés de la camptothécine, suggérant des spectres d'activité différents. Enfin, ces composés seraient de moins bons substrats des pompes d'efflux. Concernant la famille des indenoisoquinolines, deux molécules sont actuellement en essai clinique de phase I : NSC 725776 et NSC 743400 (Table 5) (Figure 16). La famille des aromathécines représente une famille hybride entre les analogues des camptothécines et les indenoisoquinolines. Pour ces composés, le cycle E est remplacé par un cycle benzène (Figure 16). Ces molécules dont un des représentants est la Rosettacin sont aux premiers stades de leur développement (Cinelli et al., 2009).

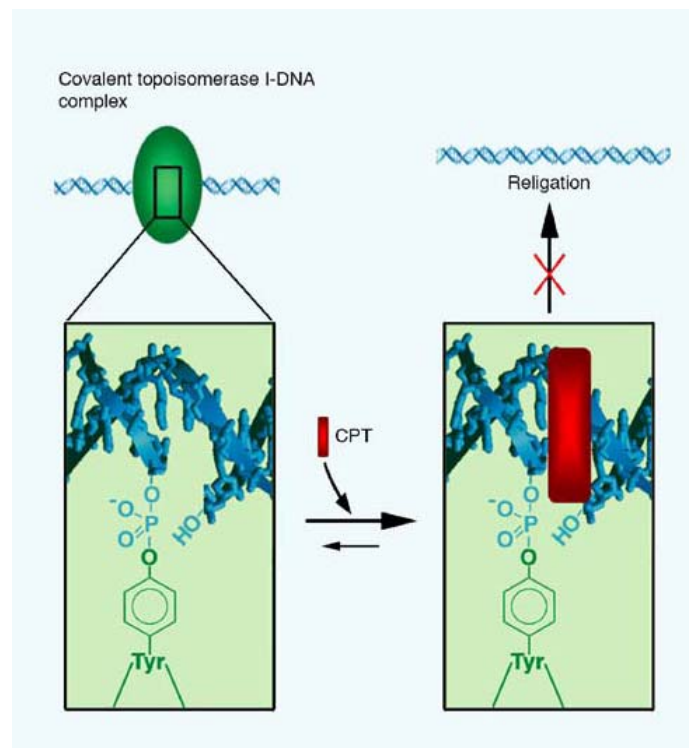
### **d. Les dibenzonaphthyridinones**

La nitidine et la phénanthridine ont été développées dans les années 1990. Différentes modifications chimiques confèrent à ces molécules un potentiel cytotoxique élevé et une plus faible affinité pour les pompes d'efflux (Figure 16). Le représentant majeur de cette famille est le topoivale (ARC-111), dont le développement clinique devrait commencer prochainement (Table 5).

## 2. Mécanisme d'action

### a. Stabilisation des complexes de clivage

La grande majorité des inhibiteurs de topoisomérase I (les dérivés de la camptothécine, les indenoisoquinolines et les indolocarbazoles) agissent de la même façon, en stabilisant les complexes de clivage. La particularité de ces molécules est de se fixer non pas sur l'ADN isolé ou la topoisomérase I isolée mais à l'interface entre ADN et topoisomérase I (Hertzberg et al., 1989). Ces molécules s'intercalent entre les bases de l'ADN au niveau du site de clivage. Un complexe ternaire entre drogue, ADN et topoisomérase I sera ainsi formé (Figure 17).



**Figure 17** - Inhibition de l'étape de religation par fixation de la camptothécine sur les complexes ADN-topoisomérase I stabilisés (Leppard and Champoux, 2005).

D'après des analyses cristallographiques, un ensemble de liaisons hydrogène, reliant le xénobiotique à la fois à l'ADN et à la topoisomérase I a pu être visualisé (Staker et al., 2005). Au cours de cette stabilisation anormalement longue des complexes de clivage, l'étape de religation du brin d'ADN clivé est inhibée. Ceci accroît fortement la probabilité d'une collision entre les machineries de réplication ou de transcription avec les complexes de

clivage stabilisés. A l'action des inhibiteurs de topoisomérase I, s'ajoute un grand nombre d'évènements physiologiques ou non qui peuvent stabiliser les complexes de clivage (Table 6) (Pommier et al., 2003).

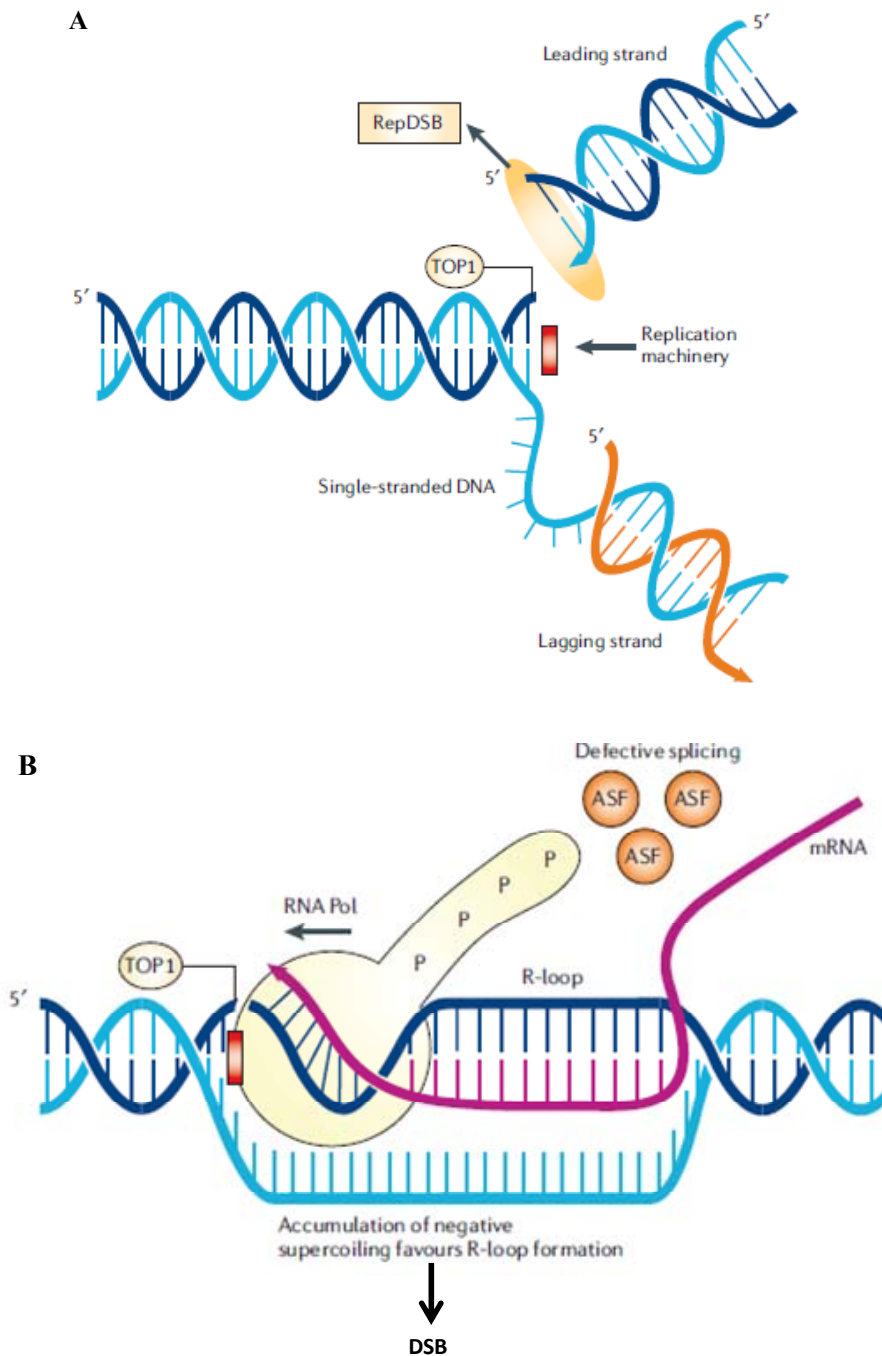
Anticancer drugs <sup>a</sup>	M <sup>b</sup>	R <sup>c</sup>	Notes
Camptothecins	T	r	Highly selective and specific
Indolocarbazoles (NB-506)	T	r	In clinical development
Actinomycin D	T	r	Other effects: DNA, RNA polymerase
Hoechst	T	r	Other effects: DNA minor groove binding
Triple helix camptothecin conjugates	T	r	Sequence specific major groove binding
Indenoisoquinolines	T	r	Developed by Cushman and Pommier
Phenanthridines and analogs	T	r	Developed by LaVoie and Liu
Ecteinascidin 743	T	r	N2-dG alkylation; NER poison
Cytosine arabinoside	T	r	Other effects: blocks DNA synthesis
Gemcitabine	T	r	Other effects: blocks DNA synthesis
Endogenous DNA lesions [13]			
Single base mismatches	T	r	Polymerase and mismatch defects
Mismatched loops	T	icc	Mismatch deficiencies
Abasic sites	T	icc	AP sites; base excision repair
8-Oxoguanosine	B	r	Free radicals: oxidative lesions
5-Hydroxycytosine	?	r	Free radicals: oxidative lesions
Single-strand breaks	T	icc	Free radicals; base excision repair
Cytosine methylation	F+T	r	Physiological
Triple helix formation	F+T	r	
Exogenous DNA lesions [13]			
UV lesions	?	?	Dimers and 6,4-photoproducts
IR-induced DNA breaks	T	icc	Both single- and double-strand breaks
O <sup>6</sup> -Methylguanine	T	r	Produced by alkylating drugs (MNG)
O <sup>6</sup> -dA-Benzo[a]pyrene adducts	T	icc	Intercalated carcinogenic adducts
N <sup>2</sup> -dG-Benzo[a]pyrene adducts	F	icc	Minor groove carcinogenic adducts
N <sup>2</sup> -dG-Benzo[c]phenanthrene adducts	T	r	Intercalated carcinogenic adducts
N <sup>6</sup> -Ethenoadenine	T	r	Carcinogenic vinyl adduct

**Table 6** – Facteurs endogènes et exogènes stabilisant les complexes de clivage (Pommier et al., 2003). T : Trapping (inhibition de la religation). B : augmentation de la liaison (Binding). F : Augmentation du clivage (Forward reaction).

Ainsi des substances chimiquement réactives sont fréquemment produites au cours de la respiration et le métabolisme des cellules engendrant des lésions de l'ADN, comme l'oxydation des bases, la formation de sites abasiques, de mésappariements ou d'adduits sur l'ADN qui peuvent stabiliser les complexes de clivage (Pourquier et al., 1997(a) ; 1997 (b) ; Pourquier et al., 1999). Enfin, la stabilisation accrue des complexes de clivage a été observée lors de l'apoptose, ceux-ci seraient stabilisés par les modifications chromatiniennes engendrées par ce processus.

## **b. Formation des dommages à l'ADN**

Un modèle de cytotoxicité par collision entre les complexes de clivage stabilisés et les fourches de réplication, au cours de la phase S du cycle cellulaire a été proposé dans les années 1990 (Zhang et al., 1990). Cette collision aurait pour conséquence de convertir les cassures simple-brin (formées au site de clivage et réversibles) en cassures double-brin de l'ADN, très dangereuses pour les cellules (Figure 18A). De façon réciproque, il a été montré que les cellules n'étant pas en phase S ou dans lesquelles la réplication est arrêtée au moment du traitement par les camptothécines sont plus résistantes au traitement (Pommier, 2006). Un traitement par inhibiteur de topoisomérase I entraîne un blocage de la synthèse d'ADN qui persiste plusieurs heures après traitement, contrairement à la stabilisation des complexes de clivage qui disparaissent très rapidement en absence du xénobiotique. Parallèlement à un blocage en phase S, un arrêt en phase G2/M du cycle cellulaire est observé et représente même parfois l'effet le plus marqué dans le cycle cellulaire. Il est décrit que de faibles doses de traitement entraînent un blocage réversible en G2 alors que des doses plus élevées causent un blocage en phase S et un arrêt en G2. Ceci est important et indique que malgré le traitement par inhibiteur de topoisomérase I, certaines cellules sont capables de progresser de la phase S à la phase G2, donc poursuivent la réplication. Plus tard, il a été proposé que les cassures d'ADN se forment aussi par collision des fourches de réplication avec les super tours positifs non éliminés par la topoisomérase I plutôt qu'avec les complexes de clivage (Koster et al., 2007). Il a également été démontré qu'à des doses élevées d'inhibiteurs de topoisomérase I, une cytotoxicité indépendante de la phase S était observée (Goldwasser et al., 1995). Dans ce processus, l'implication de la collision des machineries de transcription avec les complexes de clivage (situés sur le brin codant d'ADN à transcrire) a été invoquée. Ceci a pour conséquence, un arrêt de la transcription et la génération de cassures simple-brin d'ADN irréversibles (Figure 18B) mais aussi la formation de cassures double-brin d'ADN (Sordet et al., 2009). Ainsi un rôle non négligeable, de la transcription dans la cytotoxicité des inhibiteurs de topoisomérase I est très probable et en accord avec les grandes quantités de topoisomérase I retrouvées dans le nucléole, siège de la transcription des ARNr (Morris and Geller, 1996 ; Wu and Liu, 1997).



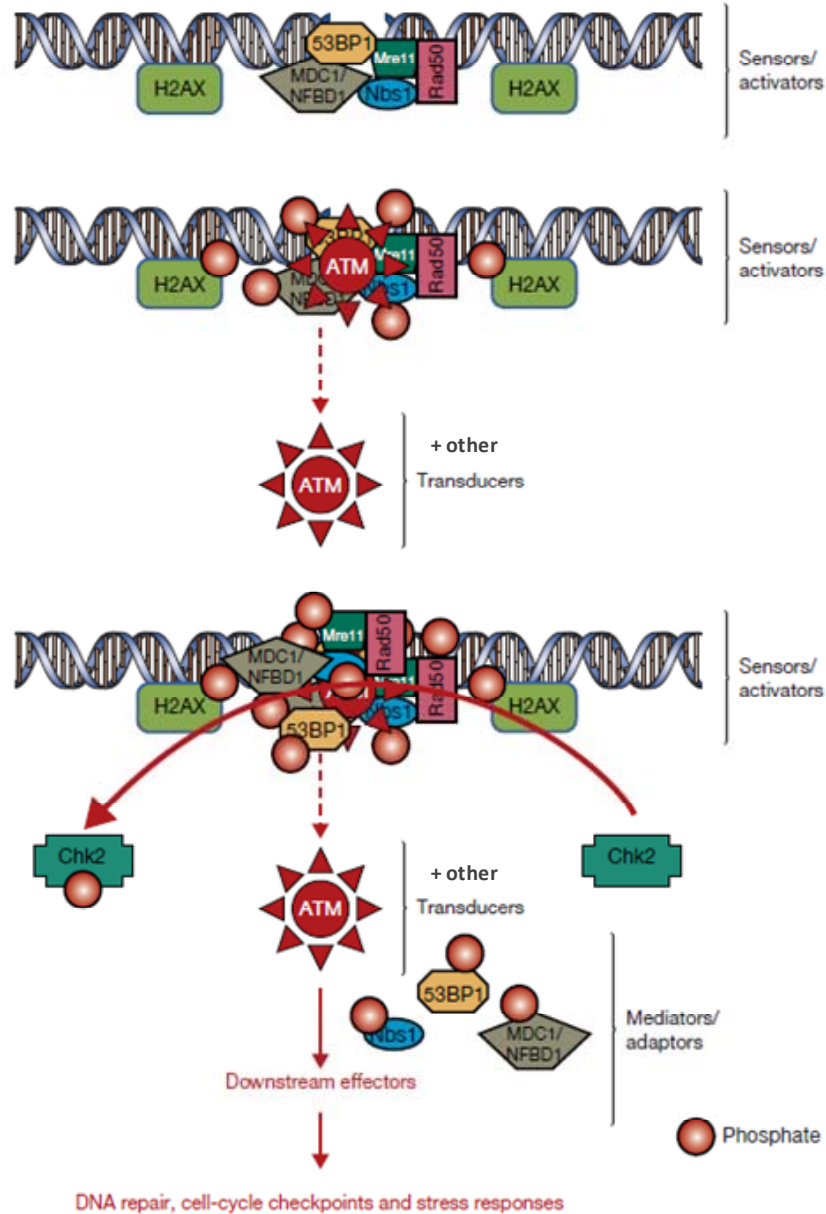
**Figure 18** - Conversion des complexes de clivage ADN-topoisomérase I en dommages à l'ADN par collision des machineries de réplication et de transcription.

A. Lorsque la machinerie de réplication rencontre un complexe de clivage situé sur le brin « direct », la collision entraînera la formation de cassures double-brin d'ADN. Sur le brin « retardé », ceci entraînera une cassure simple brin.

B. Lorsqu'une collision se produit entre la machinerie de transcription et un complexe de clivage stabilisé, cela engendrera une cassure simple brin et un arrêt de l'élongation de l'ARN. (Adapté de Pommier et al., 2006(a)).

### c. Signalisation des dommages et mort cellulaire.

Les cassures double-brin d'ADN engendrées par l'irinotecan induisent une réponse cellulaire pléiotrope qui a été largement étudiée (Figure 19).



**Figure 19** – Evènements cellulaires précoces engendrés par la formation de cassures double brin d'ADN. La formation de cassures double brin d'ADN induit le recrutement de senseurs-activateurs (sensors/activators) au site du dommage, le complexe MRN (MRE-11, Rad51 et NBS1) étant un des plus précocement recruté. Cette étape est dépendante d'ATM et d'autres transducteurs (incluant notamment ATR). Les transducteurs vont phosphorylés un grand nombre de substrats, ce qui stabilisera les protéines au niveau du dommage, induisant un foci de signalisation bien visible. Ceci permettra enfin de recruter des protéines effectrices (downstream effectors) de la réponse : réparation de l'ADN, arrêt dans le cycle ou apoptose. (Shiloh and Lehmann, 2004).

Ces lésions sont hautement toxiques pour les cellules, qui mettront en œuvre une réponse adaptée à l'étendue des cassures. La cellule tente de réparer ces lésions mais si les capacités de réparation des dommages sont dépassées, les cellules entrent en apoptose. L'orientation de la réponse cellulaire, vers la réparation ou la mort cellulaire détermine la réponse tumorale au traitement.

Dans un premier temps, les dommages sont reconnus et signalés. Au niveau de la chromatine, l'un des premiers acteurs est le variant d'histone H2AX, chargé de transmettre le signal en aval. La forme phosphorylée de cette protéine, appelée  $\gamma$ -H2AX, peut être détectée quelques minutes seulement après la formation de cassures double-brin (Furuta et al., 2003). De façon extrêmement rapide, des « senseurs » du dommage, principalement le complexe MRN (Mre11–Nbs1–Rad50) initient la réponse cellulaire en recrutant des kinases ATM, ATR et DNA-PK. Celles-ci sont activées par les modifications induites dans la chromatine et déclenchent une cascade de phosphorylation d'un grand nombre de protéines effectrices. Différents processus cellulaires sont alors alertés : l'arrêt du cycle cellulaire (activation de CHK1, CHK2), la réparation d'ADN (par Rad51/Rad52, BRCA1, Ku70/80)(Pommier et al., 2003), ou l'apoptose (rôle de p53, caspase3, caspase 8, JNK) (Shiloh and Lehmann, 2004).

### **3. Déterminants de la réponse au traitement par inhibiteur de topoisomérase**

De façon générale, la résistance à la chimiothérapie est un obstacle fréquemment rencontré lors de la prise en charge du cancer. La chimiorésistance est décrite comme une absence de réponse à des agents visant à inhiber la croissance tumorale. Celle-ci peut être intrinsèque. En effet la population cellulaire tumorale est généralement hétérogène et une sous-population cellulaire peut être d'emblée résistante. La résistance peut aussi être acquise au fur et à mesure des expositions des cellules aux traitements. Dans ce dernier cas, les clones capables de survivre en présence du cytotoxique sont sélectionnés et connaissent une expansion tumorale. De plus, l'hétérogénéité cellulaire au sein d'une tumeur suggère que plusieurs mécanismes peuvent coopérer pour induire une résistance multifactorielle, connue sous le nom de « multidrug resistance ». Les inhibiteurs de topoisomérase I et plus particulièrement le topotecan et l'irinotecan ont démontré leurs importances dans la prise en charge de différents cancers mais les phénomènes de résistance restent un problème critique à résoudre. Malgré leur place incontournable dans l'arsenal thérapeutique anticancéreux, les taux de réponse rapportés dans des essais cliniques ne dépassent pas 30% (Rothenberg, 1996 ; ten Bokkel



Huinink et al., 1997). Ceci s'explique par des réponses cliniques aux inhibiteurs de topoisomérase I qui sont souvent transitoires et justifie que l'utilisation des inhibiteurs de topoisomérase se fasse majoritairement en association avec d'autres traitements. Les mécanismes sous-jacents à cette résistance clinique *de novo* ou acquise restent mal connus, une revue récente recense ces mécanismes (Pourquier and Lansiaux, 2011). Ces phénomènes ont surtout été étudiés dans le cadre d'études précliniques *in vitro*. D'après ces données, ils impliqueraient :

- Un défaut d'accumulation du xénobiotique dans la tumeur
- Une détérioration de la cible : la topoisomérase I
- Une altération de la réponse cellulaire suivant l'interaction du xénobiotique avec sa cible

### **a. Accumulation des inhibiteurs de topoisomérase I dans les cellules**

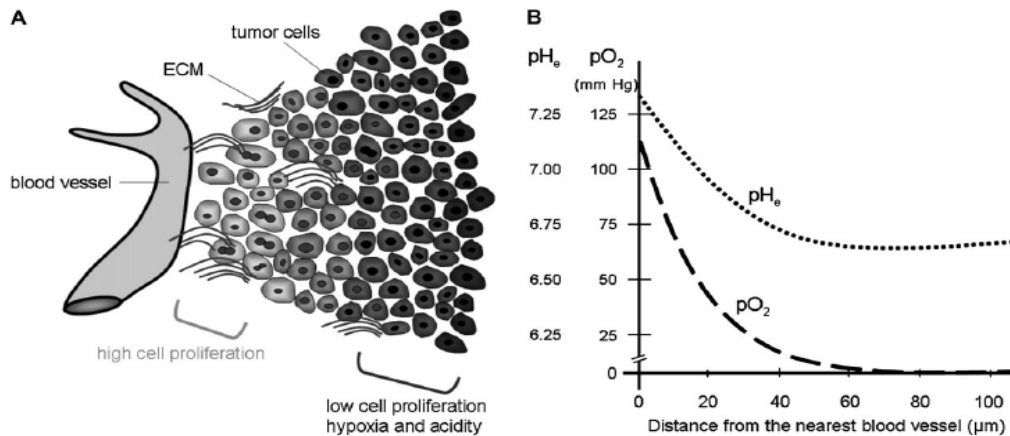
Pour être efficace, il est indispensable que le médicament injecté atteigne la circulation sanguine puis pénètre dans les cellules en quantité suffisante. De plus, nous avons vu que pour les inhibiteurs de topoisomérase I, l'accumulation sous forme lactone, forme active était primordiale. Nous rappellerons également que l'irinotecan (CPT-11) est une pro-drogue qui doit être métabolisée en un composé actif : le SN-38.

L'accumulation correcte d'un xénobiotique dans la cellule est donc dépendante de différents facteurs dont son absorption, son métabolisme et son efflux.

L'irinotecan et topotecan sont instables dans le plasma et susceptibles de se lier à l'albumine, risquant ainsi de limiter leur diffusion dans les cellules. Ce paramètre a été amélioré pour les inhibiteurs de topoisomérase I de nouvelles générations, dérivés de la camptothécine ou non. Différentes études ont également rapporté le rôle de la vascularisation tumorale pour une distribution correcte de la drogue jusqu'à la masse tumorale. Il est connu que la distribution de beaucoup de drogues est hétérogène, l'exposition à des concentrations létales sera obtenue pour une proportion de cellules tumorales seulement.

L'hétérogénéité de vascularisation tumorale a également des conséquences sur la quantité de nutriments parvenant aux cellules et induit également des zones de prolifération, d'hypoxie et d'acidité plus ou moins intenses en fonction de la proximité ou l'éloignement des vaisseaux

sanguins (Figure 20) (Tredan et al., 2007). Ce phénomène a été décrit pour les camptothécines (Bhattacharya et al., 2004).

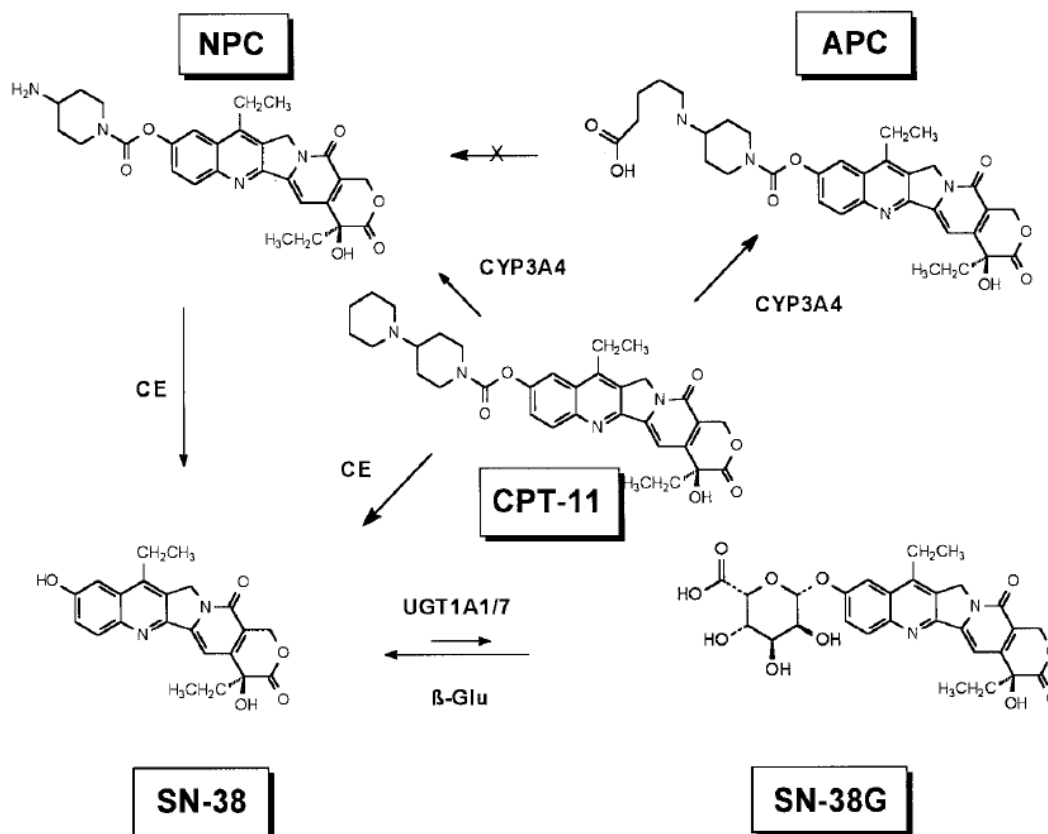


**Figure 20** – Microenvironnement tumoral en relation avec la présence de vaisseaux sanguins.

- ✓ Représentation de l'état de prolifération et d'oxygénation des cellules de la matrice extracellulaire et des cellules tumorales en fonction de la proximité par rapport à un vaisseau sanguin.
- ✓ Représentation du gradient de concentration en oxygène (pO<sub>2</sub>) (en traits) et de pH (en pointillés) (axe des ordonnées) en fonction de la distance par rapport au vaisseau sanguin le plus proche (axe des abscisses) (Tredan et al., 2007).

Le métabolisme va également gouverner de façon non négligeable l'accumulation cellulaire des inhibiteurs de topoisomérase I.

Tout d'abord, le CPT-11 possède un profil pharmacocinétique très complexe (Figure 21), qui est de plus patient-dépendant, puisqu'il nécessite différentes transformations et réactions enzymatiques (Mathijssen et al., 2001).



**Figure 21** – Métabolisme du CPT-11 : Les carboxylestérases hydrolysent le CPT-11 en SN-38, qui pourra être converti en dérivé glucuronidé (SN-38G). Le SN-38G pourra être déglucuronidé par les glucuronidases intestinales. Le CPT-11 peut également être inactivé par le cytochrome P450 3A4 en NPC et APC (Mathijssen et al., 2001).

La conversion du CPT-11 en SN-38, composé 100 à 1000 fois plus actif est effectuée par les carboxylestérases hépatiques et intratumorales et est indispensable à une activité cytotoxique. Une corrélation entre le niveau de Carboxylestérases et la sensibilité au traitement a été formulée à partir de travaux dans des lignées cellulaires et des tissus en prolifération (Kawato et al., 1991 ; van Ark-Otte et al., 1998). Le SN-38 est ensuite conjugué au glucuronide par les UDP glucuronosyltransférase (UGT) pour être détoxifié (sous forme de SN-38G) (Ciotti et al., 1999). Cette réaction de glucuronidation a également été décrite pour d'autres inhibiteurs de topoisomérase I que l'irinotecan, notamment les indolocarbazoles. Elle peut être catalysée par les isoformes hépatiques UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6, UGT1A7 et UGT19 (Hanioka et al., 2001) avec un rôle majeur des isoformes 1A1 et 1A7. Ainsi une glucuronidation accrue a été associée à une diminution de chimiosensibilité dans des lignées de cancer du poumon et de

cancer du sein (Takahashi et al., 1997 ; Brangi et al., 1999). A l'inverse, une conversion du SN-38G en SN-38 pourra être effectuée par les  $\beta$ -glucuronidases, exprimées dans l'intestin.

D'autre part, le CPT-11 peut être pris en charge par le cytochrome P450 hépatique 3A4 (CYP3A4) pour être métabolisé en composés totalement inactifs APC et NPC. Ce dernier métabolite étant majoritaire et pouvant à son tour être hydrolysé en SN-38 par les carboxylestérases.

Une augmentation de l'efflux des médicaments est un mécanisme qui a longtemps été considéré comme facteur principal de chimiorésistance. Celui-ci concerne de nombreux agents chimiothérapeutiques et entraîne une diminution des concentrations intracellulaires de médicament. Il est réalisé par des pompes d'efflux, des protéines membranaires appartenant à la famille des transporteurs de la famille des ATP-Binding Cassette (ABC). Ces transporteurs sont exprimés dans les tissus tumoraux mais on les retrouve également de façon physiologique dans certains tissus comme le cerveau, le placenta, le foie ou l'intestin. Ils protègent les cellules en éliminant certaines substances endogènes ou exogènes, dont les xénobiotiques.

Il existe dans le génome humain, 48 gènes codant pour des pompes d'efflux. Sept sous-familles ont ensuite été définies, basées sur des critères de séquence et de structure (ABC A à G) (Gottesman and Ambudkar, 2001 ; Pommier, 2006(a)). Les principales pompes d'efflux impliquées dans l'acquisition de chimiorésistance sont ABCB1 (MDR1 ou encore PGP) (Juliano and Ling, 1976 ; Ueda et al., 1987), ABCC1 (MRP1) (Cole and Deeley, 1993) et ABCG2 (MXR, mitoxantrone-resistance gene ou BCRP) (Miyake et al., 1999). ABCB1 et ABCC1 sont capables de prendre en charge une multitude d'agents thérapeutiques dont les anthracyclines (doxorubicine, daunorubicin, epirubicin), les vinca-alcaloïdes (vincristine, vinblastine), l'actinomycine-D, le paclitaxel, le docetaxel, l'etoposide ou encore le methotrexate. Les inhibiteurs de topoisomérase I ne sont pas de bons substrats de ces pompes. En revanche, il a été démontré que la majorité des inhibiteurs de topoisomérase I dont le topotecan et le SN-38 (Allen et al., 1999 ; Schellens et al., 2000 ; Maliepaard et al., 2001) peuvent être pris en charge par ABCG2, capable également d'externaliser la mitoxantrone, la doxorubicine, la daunorubicine, les anthracyclines, ou le methotrexate (Polgar et al., 2008). De plus une sur-expression de ABCG2 a été associée à la résistance au topotecan dans des cellules de cancer ovarien et à l'irinotecan et au topotecan dans des lignées de cancer du poumon (Maliepaard et al., 1999 ; Kawabata et al., 2003). Les inhibiteurs de topoisomérase I peuvent également être pris en charge par ABCC2 (MRP2 ou cMOAT).

En plus de ces différents paramètres, il semble que certains facteurs environnementaux propres à la tumeur puissent jouer un rôle dans l'acquisition de résistance. Ceci est essentiel dans les systèmes *in vivo*, puisqu'il a été montré que certaines cellules cultivées *in vitro* devenaient résistantes après transplantation *in vivo*. Ainsi l'influence de la matrice extracellulaire ou encore la géométrie de la tumeur seraient des paramètres non négligeables dans les phénomènes de résistance. Malheureusement les modèles d'étude de résistance *in vivo*, pourtant très utiles pour comprendre les phénomènes survenant chez les patients restent rares (Tredan et al., 2007).

## **b. Modification de la topoisomérase I**

Il a été démontré que la topoisomérase I était l'unique cible de la majorité des inhibiteurs de topoisomérase I. Ainsi toute altération qualitative ou quantitative de la topoisomérase I engendrera une diminution importante de l'efficacité des inhibiteurs. Différents travaux visant à caractériser des lignées résistantes aux camptothécines ont mis en évidence des mutations de la topoisomérase I, des diminutions d'expression de l'enzyme ou l'association de ces deux phénomènes (Morham et al., 1996). Les travaux à l'origine de ces recherches montraient que des mutations de la topoisomérase I étaient retrouvées à l'état naturel dans les différentes parties de la plante produisant la camptothécine. Un mécanisme évolutif permettant la sélection des souches productrices de la drogue (Sirikantaramas et al., 2008). Plusieurs mutations dans le gène de la topoisomérase I, isolées à partir de lignées cellulaires ont ensuite été recherchées et associées à une résistance aux inhibiteurs de topoisomérase I. Ces mutations se situent dans les régions codant pour les domaines les plus conservés de l'enzyme : le corps et le domaine C-terminal. Il s'agit de mutations déjà retrouvées dans les plantes productrices de la camptothécine. Les différentes mutations rapportées peuvent conduire à une altération de l'activité enzymatique de la protéine ou à une atténuation de l'interaction entre l'enzyme et l'inhibiteur (Chrencik et al., 2004). De façon tout à fait intéressante, les résidus portant les mutations sont les mêmes que ceux impliqués dans la fixation de l'enzyme sur l'ADN. Il a été démontré que la présence d'une de ces mutations n'empêche pas la fixation de l'enzyme sur l'ADN mais réduit probablement le temps de rétention des complexes de clivage. Si l'importance des mutations de la topoisomérase I est clairement démontrée dans l'acquisition de résistance *in vitro* et *in vivo*, ces altérations n'ont

été décrites que très rarement dans des tumeurs de patients (Tsurutani et al., 2002). De plus, leur association avec des phénomènes de résistance aux inhibiteurs de topoisomérase I reste à démontrer en clinique. Différents travaux ont également rapportés qu'une topoisomérase I intacte en séquence mais dont l'expression protéique était diminuée pouvait être associée à une résistance aux camptothécines. Cette notion a été démontrée par différents travaux menés *in vitro* et *in vivo*, visant à stimuler ou inhiber l'expression de la topoisomérase I, induisant ainsi une amélioration ou une altération de la réponse au traitement, respectivement (Bjornsti et al., 1989 ; Burgess et al., 2008 ; Toyoda et al., 2009).

L'expression protéique de la topoisomérase I peut être régulée à différents niveaux. Tout d'abord, au niveau transcriptionnel, le promoteur du gène peut être méthylé, conduisant à une inhibition de sa transcription (Fujimori et al., 1996). Cette altération épigénétique est bien connue, elle est réalisée par des ADN méthyltransférases et conduit à une inhibition de la transcription de nombreux gènes. Pour la topoisomérase I, ce phénomène a été proposé comme mécanisme de résistance en altérant directement l'expression génique de la topoisomérase I et celle de gènes en aval, contrôlant le cycle cellulaire ou l'apoptose en réponse aux inhibiteurs de topoisomérase I (Crea et al., 2009). Des régulations post-traductionnelles de la topoisomérase I ont également été décrites. La protéine peut être ubiquitinée ou sumoylée, il s'agit de l'ajout de résidus ubiquitin ou SUMO (pour *Small Ubiquitin-like Modifiers*, une protéine qui présente 18% d'homologie avec l'ubiquitin). Ces modifications semblent réguler une multitude de processus cellulaires (Liu et al., 2000 ; Kanagasabai et al., 2009). De façon très intéressante, ces deux types de régulation sont stimulés par l'administration d'inhibiteurs de topoisomérase I et ciblent spécifiquement la topoisomérase I impliquée dans un complexe de clivage. En revanche, alors que le processus de sumoylation nécessite une transcription active dans les cellules, le phénomène d'ubiquitination reste fonctionnel lorsque la réplication et la transcription sont bloquées par des inhibiteurs spécifiques. L'ubiquitination est un signal induisant la dégradation de la protéine par le protéasome (Desai et al., 1997). Ce mécanisme de collaboration entre ubiquitin et protéasome 26S a donc été proposé comme un mécanisme de résistance, en privant les inhibiteurs de topoisomérase I de leur cible (Desai et al., 2001). La sumoylation semble être une modification post-traductionnelle plus fréquente que l'ubiquitination, qui ne concerne que 5 à 10% de la topoisomérase I engagée dans les complexes de clivage. D'autre part, il semble que le pool de protéine sumoylée ou ubiquitinée soit différent. En revanche, le phénomène de sumoylation est assez mal connu et des fonctions contradictoires de ce processus ont été

décrites. Elle pourrait gouverner la dégradation de l'enzyme ou son externalisation du nucléole (Mo et al., 2002 ; Rallabhandi et al., 2002). Elle pourrait également réparer mais à l'inverse aussi stimuler la formation des complexes de clivage (Mao et al., 2000 ; Horie et al., 2002). Au final, des travaux ont rapporté qu'un défaut dans le processus de sumoylation sensibilise les cellules aux agents génotoxiques dont les inhibiteurs de topoisomérase I.

### **c. Altération de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN**

La stabilisation de la topoisomérase I sur l'ADN peut être induite par les inhibiteurs de topoisomérase I mais également par d'autres événements endogènes et exogènes (Table 6) (Pourquier and Pommier, 2001). Ainsi les causes et fréquences d'apparition de ces phénomènes sont relativement élevées dans une cellule. Hors, les lésions qui peuvent être engendrées par l'immobilisation de complexes protéiques sur l'ADN sont très dangereuses pour les cellules. Ceci suggère le besoin des cellules de développer des mécanismes de reconnaissance et de réparation de ces différents types de dommages, dans différentes circonstances pathologiques mais également physiologiques. Beaucoup d'études se sont intéressées à la réparation des dommages induits par les inhibiteurs de topoisomérase I et il apparaît que les cellules peuvent prendre en charge ces lésions à différents niveaux. D'une part, les complexes de clivage sont excisés de l'ADN (en 3'). Ceci est une étape importante permettant d'une part, d'éviter leur conversion en lésions irréversibles et d'autre part d'améliorer l'accessibilité à l'ADN et aux dommages à prendre en charge. Si les complexes de clivage ont été convertis en cassures de l'ADN, par le métabolisme cellulaire, ces lésions peuvent ensuite être prises en charge. Enfin, l'extrémité 5' de l'ADN peut être reliquée. La réponse cellulaire aux inhibiteurs de topoisomérase I est complexe et bien réglée dans le temps. De façon préalable à la prise en charge des dommages à l'ADN, la cellule doit mettre en place un arrêt dans le cycle cellulaire. L'activation de points de contrôle dans le cycle cellulaire (ou Checkpoint) empêche les cellules portant des altérations sur l'ADN d'entrer en mitose et laisse le temps nécessaire à la mise en œuvre des mécanismes de réparation. De plus, la formation de dommages supplémentaires sera limitée par l'arrêt momentané des fourches de réplication. Enfin, après la réparation, la progression des fourches de réplication devra être réactivée normalement.

### ✓ Arrêt dans le cycle cellulaire

Il est bien décrit que les points de contrôle d'entrée en phases S et G2 sont activés par les dommages engendrés par les inhibiteurs de topoisomérase I (Shao et al., 1997). Parmi les protéines de contrôle du cycle cellulaire activées par ces traitements, nous citerons Chk1, Chk2, p53, c-Abl ou encore les kinases de stress JNK/SAPK (*Jun N-terminal Kinase/Stress Activated Protein Kinase*). Chk1 et Chk2 sont deux kinases effectrices majeures dans le contrôle du cycle cellulaire. Les phosphorylations de Chk1 et Chk2 sont régulées respectivement par les kinases ATR et ATM. L'activation de ces deux protéines apparaît rapidement après exposition aux inhibiteurs de topoisomérase I. En inactivant les acteurs clés de la progression dans le cycle cellulaire, notamment, les différents membres de la famille cdc25 (des phosphatases indispensables à la progression dans le cycle cellulaire) ou certaines cyclines, ces protéines induisent un blocage de la transition G1/S et G2/M. Le rôle de Chk1 et Chk2 a été largement étudié. Il est clairement montré qu'une déficience ou une inhibition pharmacologique de l'une ou l'autre de ces protéines sensibilisent fortement les cellules aux drogues ciblant la topoisomérase I. En revanche, ces deux protéines ont des rôles distincts après exposition aux inhibiteurs de topoisomérase I (Huang et al., 2008). Alors que Chk1 serait préférentiellement activée par le blocage des fourches de réplication, l'activation de Chk2 serait déclenchée par les cassures double-brin de l'ADN.

La voie de signalisation p53/p21 joue également un rôle primordial dans la réponse aux drogues ciblant la topoisomérase I. La stabilisation et l'activité transcriptionnelle de p53 joueraient un rôle dans l'arrêt prolongé dans le cycle cellulaire, à la transition entre G1 et S et G2 et M (Zhao et al., 2008).

La réponse cellulaire conduisant à l'arrêt dans le cycle cellulaire est complexe et fait intervenir de nombreuses communications entre les acteurs cités précédemment. Il a été démontré que l'absence de l'un de ces acteurs entraîne une sensibilisation aux inhibiteurs de topoisomérase I (Pommier et al., 2003 ; Pommier et al., 2006(a)).

### ✓ Réparation des complexes de clivage ADN-topoisomérase I

Du fait de leur encombrement stérique important, les complexes de clivage ne peuvent être pris en charge que par certains mécanismes de réparation. Trois mécanismes sont capables de les réparer.

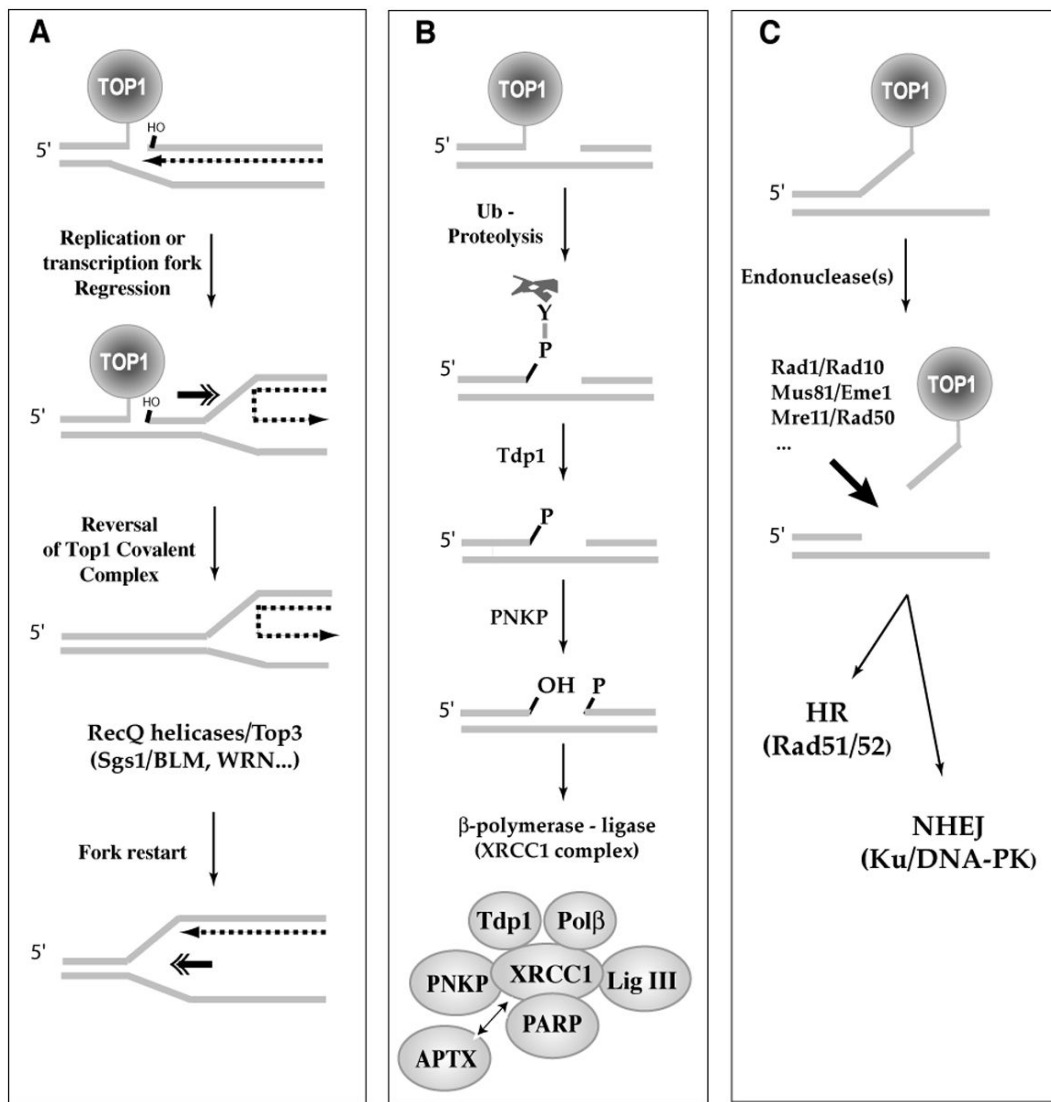
Le premier consiste en la réversion du complexe de clivage en faisant une religation en 5' de l'ADN. De façon préalable à cette religation, les deux extrémités des brins d'ADN à lier



doivent être alignées et la régression des fourches de réplication ou de transcription doit avoir lieu (Figure 22 A). Différentes hélicases de la famille recQ, sont impliquées dans la régression puis le redémarrage des fourches de réplication (Pommier et al., 2006(b)). La régression serait induite par la formation de structures particulières de l'ADN, des structures à quatre brins d'ADN appelées *hollidays junction* (ou *chicken foot*). Ces structures résultent de l'appariement entre les brins nouvellement synthétisés d'une part et les brins parentaux d'autre part. Différentes études ont invoqué le rôle collaboratif des deux hélicases, WRN et BLM en collaboration avec la topoisomérase 3 dans ce processus (Davies et al., 2004 ; Pommier, 2006(b) ; Machwe et al., 2006). Le rôle majeur joué par ces deux hélicases dans la réplication est souligné par le phénotype de lignées déficientes en l'une de ces protéines, présentant des anomalies de réplication et une hyper sensibilité aux agents inhibant la réplication notamment les inhibiteurs de topoisomérase I (Lebel and Leder, 1998 ; Pichierri et al., 2000 ; Pichierri et al., 2001 ; Davies et al., 2004).

Le second mécanisme de réparation des complexes de clivage est un processus d'excision se déroulant en plusieurs étapes (Figure 22B). La liaison phosphodiester entre le résidu tyrosine de l'enzyme et la région 3' de l'ADN est hydrolysée par une enzyme spécifique : la tyrosyl-DNA phosphodiesterase ou Tdp1. Cette enzyme identifiée en 1999 par Poliot et al. n'agit pas seule mais nécessite tout un complexe protéique de réparation, recruté au niveau de la liaison covalente entre ADN et enzyme (Plo et al., 2003). Tout d'abord, la protéine PARP-1 se fixe au niveau de la liaison covalente et recrute Tdp1, la phosphatase PNKP ainsi que le complexe ligase III/XRCC1. L'ensemble de ces protéines est chargé d'une part d'hydrolyser le résidu 3' phosphate généré par l'action de Tdp1 puis de religuer l'ADN (Pommier et al., 2006(b)). D'autre part, il semble que l'action de Tdp1 nécessite une modification préalable de la topoisomérase I (Debethune et al., 2002), une protéolyse ou une dénaturation, permettant au pont phosphotyrosyl d'être attaqué. Il a été proposé que le processus ubiquitin / proteasome 26S puisse jouer un rôle à ce niveau (Desai et al., 2003). Cette voie joue un rôle prédominant dans la réponse au traitement par inhibiteur de topoisomérase I, car la déficience des acteurs cités précédemment (notamment Tdp1, PARP-1, PNKP et XRCC1) sensibilise les cellules à la camptothécine (Miao et al., 2006 ; Rasouli-Nia et al., 2004 ; Barrows et al., 1998 ; Chatterjee et al., 1989). A l'inverse, une sur-expression de ces acteurs (notamment Tdp1, XRCC1 et PARP-1) entraîne une résistance accrue à la camptothécine (Barthelmes et al., 2004 ; Park et al., 2002 ; Staron et al., 1996).

Enfin, les complexes de clivage peuvent être pris en charge par des mécanismes d'excision alternatifs à celui impliquant Tdp1 (Figure 22C) (Connelly and Leach, 2004 ; Deng et al., 2005). L'existence de tels mécanismes a été démontrée par le fait que des lignées déficientes en Tdp1 n'étaient sensibilisées aux camptothécines qu'en présence de mutations dans d'autres voies de réparation (Vance and Wilson, 2001). Notamment le mécanisme de réparation par excision de nucléotide (*Nucleotide excision repair*, NER), faisant intervenir les endonucléases XPF/ERCC1 ou encore le complexe Slx4/Slx1 semble fonctionner en parallèle et de façon redondante par rapport à Tdp1. D'autre part, les complexes Mus81/Eme1 et Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) représentent des mécanismes alternatifs de réparation des complexes de clivage qui ne semblent pas redondants avec Tdp1. L'endonucléase FEN-1 joue également un rôle dans la réparation des complexes de clivage, en collaboration avec l'hélicase WRN et la protéine RPA.



**Figure 22** – Représentation schématique des trois mécanismes de réparation des complexes ADN-Topoisomérase I

A- La religation de l'extrémité d'ADN en 5' nécessite la régression préalable des fourches de réplication ou des complexes de transcription. La régression et le redémarrage des fourches requièrent l'activité de différentes hélicases (comme BLM et WRN) en association avec la Topoisomérase III.

B- L'excision de la topoisomérase I par Tdp1 nécessite la protéolyse ou la dénaturation préalable de la topoisomérase I, permettant au pont phosphotyrosyl d'être attaqué. Tdp1 va générer un 3'Phosphate libre qui devra être hydrolysé par l'enzyme polynucleotide kinase phosphatase (PNKP).

C- L'excision des complexes ADN-topoisomérase I pourra se faire grâce aux endonucléases (les systèmes Rad1/Rad10, Mus81/Eme1 et Mre11/Rad50). Les lésions d'ADN résultant de l'activité des endonucléases seront certainement résolues par recombinaison homologue (le complexe Rad51/ Rad52) ou par jonction non homologues des extrémités (NHEJ) (voie Ku-DNA-PK). (Pommier et al., 2006(b)).

### ✓ Réparation des lésions de l'ADN

Après excision de la topoisomérase I, l'accessibilité aux lésions des brins d'ADN est facilitée. Différents mécanismes prennent alors en charge les lésions de l'ADN. De façon majoritaire, il s'agit de cassures double-brin d'ADN. Elles peuvent être réparées par deux mécanismes. Le premier est un processus de jonction non homologue des extrémités (*nonhomologous end-joining* ou NHEJ), qui catalyse le raccord direct des extrémités de la cassure, favorisant l'introduction d'erreurs dans l'ADN. Le second représente un mécanisme de plus grande fidélité, par recombinaison homologue. Il s'agit de l'échange de matériel chromosomique entre deux chromatides sœurs (Figure 23A).

Le NHEJ fait intervenir principalement les protéines Ku70 et Ku86 ainsi que la kinase DNA-PK et la nucléase Artémis (Lieber et al., 2003). La recombinaison homologue nécessite l'action des protéines Rad51/Rad52 (Haber, 2006 ; Sung and Klein, 2006). Ce dernier processus agit spécifiquement en fin de la phase S et en phase G2 du cycle cellulaire alors que le NHEJ est actif tout au long du cycle cellulaire. Le recrutement de ces deux mécanismes nécessite la signalisation préalable du dommage par le complexe MRN (Paragraphe 2c). Le rôle important de ces deux mécanismes dans la réparation des dommages causés par les inhibiteurs de topoisomérase I est souligné par la sensibilité accrue aux camptothécines dans des lignées déficientes pour l'un des deux processus (Table 7).

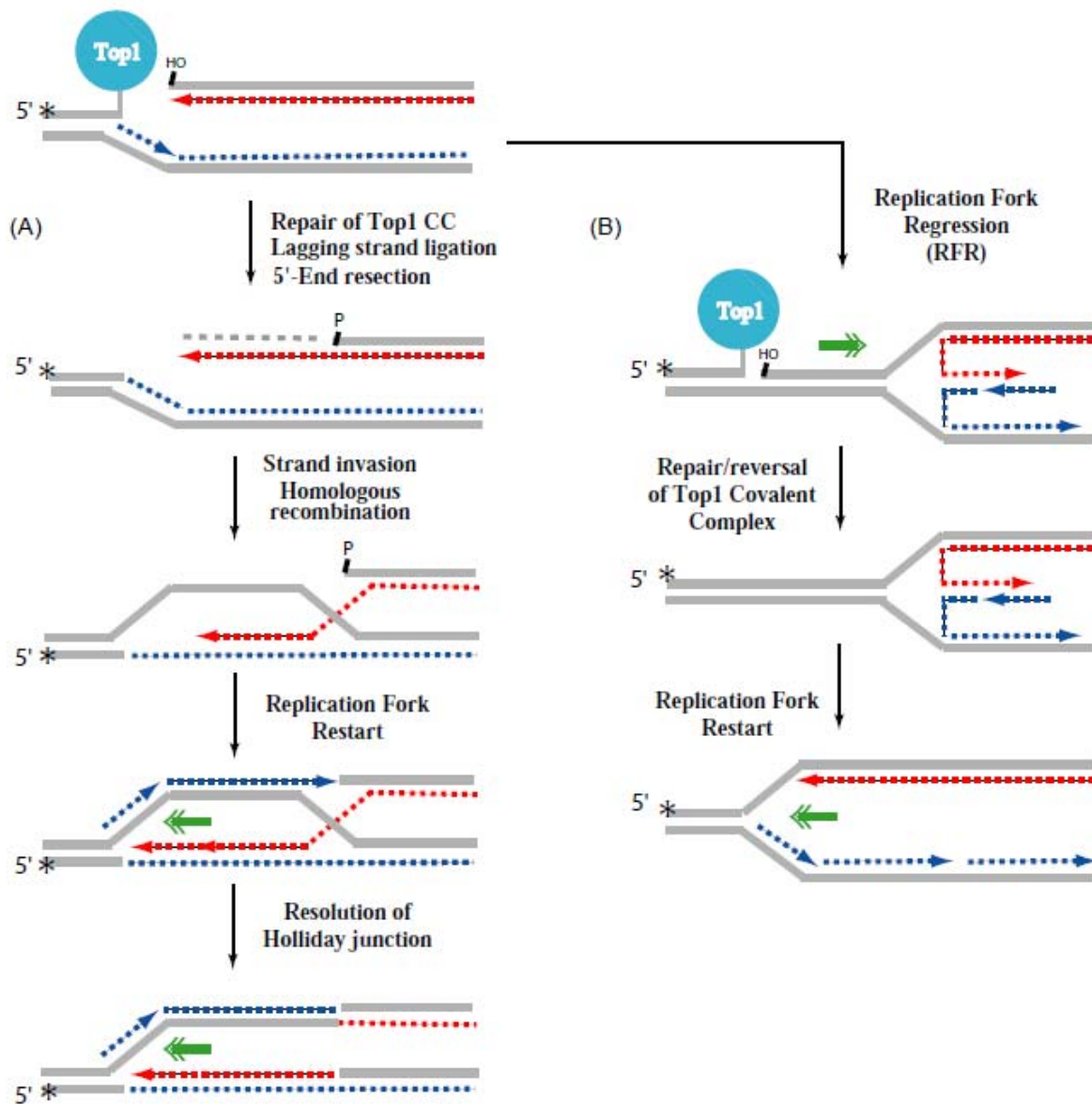
Budding Yeast (YSC)			Function	Humans		
Gene	Effect	References		Gene	Effect	References
RAD52/51			homologous recombination (HR)			
RAD52 <sup>a</sup>	HS	[102,107,187,188,278,279]	Strand annealing	RAD52	?	
RAD51	HS	[102,107,188]	RecA homolog; strand invasion	RAD51C	HS	[274]
RAD55	HS	[102,107]	Strand annealing, exchange	XRCC2	HS	[124,272,273]
RAD57	HS	[102,107]	Strand annealing, exchange	XRCC3	HS	[272]
RAD54	HS	[102]	ATPase			
MMS1	S	[280]	Replication repair/epistatic Rad52			
RAD59	MS	[102]	Rad52-related recombination			
MRX (MRN)			3'-nuclease/checkpoint (HR + NHEJ)			
MRE11	HS	[95,102,187]	MRX/N complex; nuclease	MRE11	?	
RAD50	HS	[107,188]	MRX/N complex; scaffold	RAD50	?	
XRS2	HS	[107]	MRX/N complex; signaling	NBS1	HS	[156,185]
Mus81/Mms4 (Mus81/Eme1)			3'-flap endonuclease			
MUS81	MS	[102,103,107]	3'-Flap endonuclease with Mms4	MUS81	?	
MMS4	MS	[102,103]	Partner for Mus81 nuclease	EME1	?	
Tdp1-PNKP			3'-end processing			
TDP1	CS <sup>b</sup>	[95,102]	Tyrosyl-DNA phosphodiesterase	TDP1	?	
TPP1	CS <sup>b,c</sup>	[96,102]	Polynucleotide 3'-phosphatase	PNKP <sup>b</sup>	?	
APN1	CS <sup>b,c</sup>	[95,102,188]	AP endonuclease (endo IV family)			
APN2	CS <sup>b,c</sup>	[95,102]	AP endonuclease (exo III family)	APE1	?	
Rad1/Rad10 (XPF/ERCC1)			3'-endonuclease			
RAD1	CS <sup>b</sup>	[95,102,188]	3'-Flap endonuclease with Rad10	XPF	NS	
RAD10	CS <sup>b</sup>	[95,102]	Partner for Rad1	ERCC1	NS	
Rad27 (FEN1)			5'-endonuclease			
RAD27	MS	[102]	5'-Flap endonuclease	FEN1	?	
RecQ/Top3			helicases/topoisomerase			
SGS1	MS	[103,107]	Top3-associated helicase	WRN	HS	[231-233]
SRS2	MS	[102]	Rad51-associated helicase	BLM	HS	[234]
TOP3	S	[102,103]	Replication/recombination topoisomerase	TOP3 $\alpha$		
TOP3 $\beta$	?					
9-1-1			("PCNA-like") clamp			
DDC1	MS	[102]	Replication/Repair clamp; "9-1-1"	RAD9	?	
RAD17	MS	[107,188,205]	Replication/Repair clamp; "9-1-1"	RAD1	?	
MEC3	MS	[107]	Replication/Repair clamp; "9-1-1"	HUS1	?	
RAD24	MS	[187]	Clamp loader for 9-1-1	RAD17	?	
Sensor PI(3)K-related protein kinases						
MEC1	HS	[187,188]	PI3LK checkpoint sensor kinase	ATR	HS	[200]
DDC2	?		Partner for MEC1	ATRIP	?	
TEL1	S	[187]	PI3LK checkpoint sensor kinase	ATM	HS	[155,157,158,271]
			PI3LK checkpoint sensor kinase	DNA-PK	HS	[39,272]
Transducer protein kinases; BRCT proteins						
RAD53	MS	[188]	Checkpoint effector kinase	CHK2	?	
RAD9	MS	[187,188]	Adaptor for checkpoint kinases	MDC1	?	
				BRCA1	HS	[244]

**Table 7** – Altérations génétiques conférant une hypersensibilité aux inhibiteurs de topoisomérase I chez la levure (Gauche) et chez l'homme (Droite) (Pommier et al., 2003). Abréviations : HS : Hyper-Sensibilité ; S : Sensibilité ; MS : Sensibilité Modérée ; CS : Sensibilité Conditionnelle.

De façon alternative au NHEJ et à la recombinaison homologue, un mécanisme de réparation peut être mis en œuvre suite à la régression des fourches de réplication. Les structures particulières induites par ce phénomène (Paragraphe 3c) nécessitent, en effet, une réparation. Le rôle des hélicases WRN et BLM a été prouvé dans la prise en charge de ces lésions,

notamment au cours de l'échange des brins d'ADN servant de matrice, permettant à la réplication de se poursuivre (Figure 23B). De plus, il a été démontré que WRN et BLM pouvaient interagir avec des acteurs du NHEJ ou de la recombinaison homologue.

Le grand nombre de mécanismes prenant en charge les lésions créées par les inhibiteurs de topoisomérase I ainsi que les phénotypes d'hyper-sensibilité à ces drogues engendrés lors de la délétion des acteurs de chacune de ces voies (Table 7) prouvent l'importance et la redondance de chacun de ces mécanismes. Il est également important de remarquer que les gènes associés à l'hypermensibilité des camptothécines sont souvent altérés dans les cellules tumorales, ce qui peut expliquer que l'index thérapeutique de ces molécules soit en faveur des tissus tumoraux par rapport aux tissus sains.



**Figure 23** – Mécanisme de réparation des cassures double-brin d'ADN

- A. Après excision du complexe de clivage, l'extrémité 5' est digérée, produisant un segment d'ADN avec une extrémité 3' libre. Ce segment servira de matrice pour la recombinaison homologue.
- B. La régression des fourches de réplication permet la réversion du complexe de clivage et conduit à la formation de structures intermédiaires à quatre brins, qui seront ensuite résolues par le complexe hélicases/topoisomérase III.

(Pommier et al., 2003)

✓ Induction de la mort cellulaire par apoptose

Si les lésions induites par les inhibiteurs de topoisomérase I ne sont pas réparées, elles entraîneront la mort des cellules par apoptose.

La voie apoptotique majoritairement déclenchée est la voie mitochondriale, au cours de laquelle la perméabilisation de la membrane mitochondriale conduira notamment à la libération d'un grand nombre de molécules pro-apoptotiques dans le cytoplasme. Ce processus est régi par des protéines de la famille de Bcl-2, régulant l'intégrité de la membrane mitochondriale. Cette famille de protéines peut être divisée en deux groupes. D'un côté, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bfl-1/A1 ayant un rôle anti-apoptotique et à l'inverse Bax, Bak, Bok, BclxS, Bad, Bim, Bid, Bik, Hrk, Noxa, Puma possédant une activité pro-apoptotique. De façon respective, la sur-expression des protéines de l'un ou l'autre de ces groupes inhibera ou stimulera la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Igney and Krammer, 2002) (Sordet et al., 2003). Les inhibiteurs de topoisomérase I induisent l'expression des protéines pro-apoptotiques telles que Bax, Noxa ou Bcl-xS et répriment l'expression de Bcl-2 et Bcl-xL, déplaçant ainsi l'équilibre vers l'induction de l'apoptose (Mei et al., 2007 ; Zhang et al., 2008). Au cours de la perméabilisation membranaire, le relarguage du cytochrome c, de Smac/DIABLO, de HtrA2/Omi, de AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) et de l'endonuclease G jouent un rôle important dans l'induction de la mort cellulaire.

D'autre part, la réponse apoptotique peut être médiée par le récepteur de mort Fas. La stimulation de ce récepteur, notamment par son ligand FasL, déclenchera, en effet, le processus apoptotique.

Au final, la stimulation de ces deux voies permet d'induire le clivage et l'activation des protéines de la famille des caspases. Ce mécanisme est bien régulé : l'activation de caspases initiatrices (caspases 8, 9 et 10) déclenchera l'activation de caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7). La stimulation de ces protéines va conduire au clivage de différentes cibles intracellulaires, qui induiront au final les changements morphologiques et biochimiques liés à l'apoptose : la déformation de la structure cellulaire et le clivage de l'ADN génomique. Une des cibles des caspases est PARP-1, Poly (ADP-ribose) Polymerase-1, une protéine jouant un rôle majeur dans la réponse aux inhibiteurs de topoisomérase I, au cours de la signalisation et la réparation des dommages (Paragraphe 3c) mais également dans l'induction de l'apoptose, si les capacités de réparation de la cellule sont dépassées (D'Onofrio et al., 2011). Le déclenchement de ces deux voies apoptotiques distinctes requière des interactions moléculaires coordonnant l'apparition des dommages avec l'induction des effecteurs de l'apoptose. Les protéines Chk2 et surtout c-Abl permettront de faire ce lien. Ces dernières sont activées par les kinases ATM, DNA-PK and ATR, jouant déjà un rôle comme senseur des dommages. Les inhibiteurs de topoisomérase I sont capable d'activer c-Abl, qui induit des



protéines pro-apoptotiques comme p53, p73, SAPK (*Stress Activated Protein Kinase*) et inhibe des molécules anti-apoptotiques comme Bcl-xL, AKT and NF-kB (Nuclear factor Kappa B). Même s'il a été montré que NF-kB était capable d'induire l'apoptose dans certains types cellulaires, son rôle principal est d'induire la survie cellulaire. De façon paradoxale les inhibiteurs de topoisomérase I sont capables d'activer NF-kB (Huang et al., 2000). Différentes études, montrant l'effet synergique de la combinaison inhibiteur de topoisomérase I à des modulateurs de l'apoptose (anticorps activateurs du récepteur Fas, Inhibiteurs de Bcl-2/Bcl-xL, inhibition de NFkB) prouvent l'implication des différentes voies énumérées précédemment dans le processus apoptotique déclenché par les inhibiteurs de topoisomérase I (Cusack et al., 2000 ; Lei et al., 2007 ; Okumura et al., 2008 ; Lagadec et al., 2008 ; Cao et al.2010).

Ainsi la balance relative entre les voies pro et anti-apoptotiques détermine la réponse aux inhibiteurs de topoisomérase I. Il a notamment été rapporté que la sur-expression de Bcl-2 ou Bcl-xL (Schulze-Bergkamen et al., 2008 ; Arakawa et al., 2009), la balance entre l'expression de Noxa et Mcl-1 (Mei et al., 2007), l'activation de la voie NF-kB (Huang et al., 2000) ou encore l'activation de la voie PI3K/AKT (Knuefermann et al., 2003) peut induire la résistance aux camptothécines.

Au final, la résistance aux inhibiteurs de topoisomérase I peut être causée par un grand nombre de processus. Pour la résistance acquise après traitement aux inhibiteurs de topoisomérase I, celle-ci est généralement due à une diminution de l'expression de la topoisomérase I ou des mutations du gène. En revanche, concernant la résistance intrinsèque, elle n'implique généralement pas de diminution de l'expression de l'enzyme et souvent les taux de complexes stabilisés sont normaux. Dans ce cas, différents mécanismes sont incriminés, notamment l'induction de l'apoptose, l'arrêt dans le cycle cellulaire ou encore la réparation de l'ADN (Goldwasser et al., 1996). Pour explorer ces mécanismes, de nouveaux modèles expérimentaux sont nécessaires.

#### **4. Les inhibiteurs de topoisomérase I dans la prise en charge du neuroblastome**

Après l'approbation respective de l'irinotecan pour le cancer du poumon et de l'utérus puis du topotecan pour le cancer de l'ovaire, ces composés ont été testés en préclinique dans un grand nombre de pathologies, notamment pédiatriques (sarcome, rhabdomyosarcome, tumeurs

d'Ewing, tumeurs cérébrales et neuroblastome). Ainsi, à la fin des années 1990, plusieurs équipes ont démontré une réelle efficacité de l'irinotecan et du topotecan dans des modèles de xénogreffes de neuroblastome (Houghton et al., 1995 ; Vassal et al., 1997 ; Thompson et al., 1997 ; London et al., 2010). Le développement clinique de ces composés a ensuite débuté en oncologie pédiatrique. Il est rapidement apparu que ces composés étaient plus actifs en association à d'autres chimiothérapies qu'en monothérapie. Concernant le neuroblastome, les associations entre les inhibiteurs de topoisomérase I et d'autres chimiothérapies conventionnelles du neuroblastome ont apporté de réels bénéfices, particulièrement dans la prise en charge des neuroblastomes réfractaires. La combinaison cyclophosphamide et topotecan représente le traitement de première ligne des neuroblastomes de haut risque nouvellement diagnostiqués (pour le Children's Oncology Group) (London et al., 2010). D'autre part, l'irinotecan est associé à des hautes doses de cyclophosphamide et de vincristine pour les neuroblastomes chimiorésistants ou réfractaires (notamment au topotecan) (Kushner et al., 2011). De même l'association irinotecan et temozolomide (Bagatell et al., 2011) est utilisée dans la prise en charge des neuroblastomes réfractaires.

Ainsi une toxicité acceptable associée à une efficacité et de ces composés, notamment contre les neuroblastomes en rechute prédise un avenir prometteur de ces composés dans la prise en charge du neuroblastome.

### **Partie . 3 Objectifs et plan de thèse**

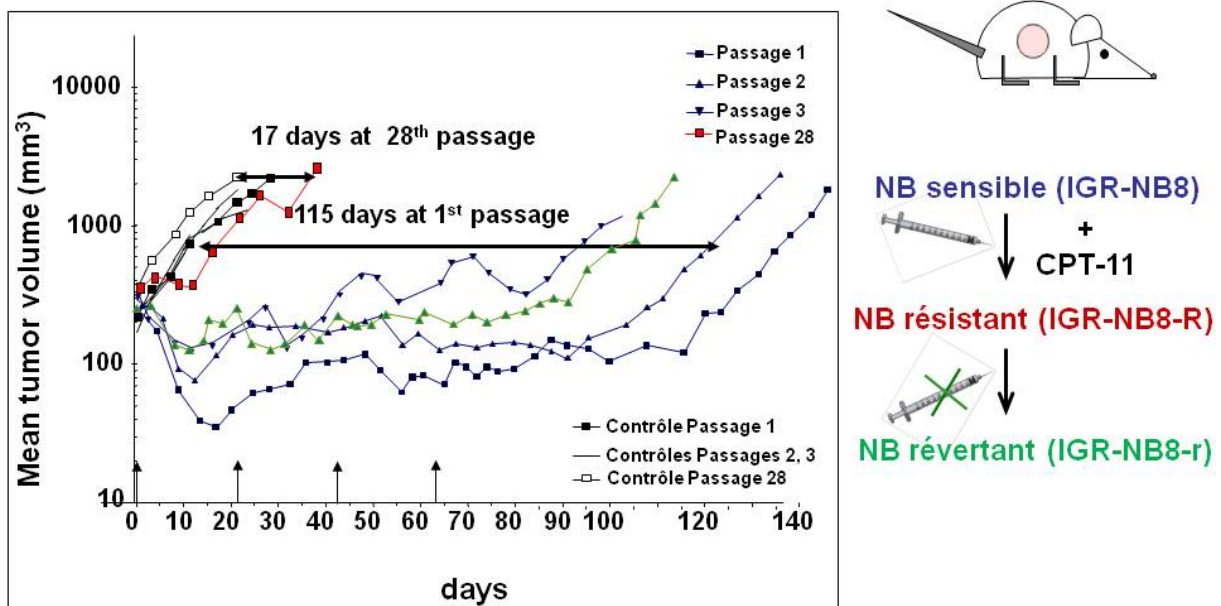
Nous avons vu que le pronostic du neuroblastome reste très variable et malgré l'introduction de nouveaux protocoles thérapeutiques, les neuroblastomes de mauvais pronostic sont toujours associés à un taux de survie inférieur à 40%.

L'objectif de ce travail de thèse est d'identifier et d'analyser l'implication de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des neuroblastomes et plus particulièrement des neuroblastomes résistants aux inhibiteurs de topoisomérase I.

Les inhibiteurs de topoisomérase I représentent un outil prometteur dans l'arsenal thérapeutique utilisé contre les neuroblastomes de haut risque. En revanche, leur efficacité, faible en monothérapie est de plus limitée par l'acquisition de phénomènes de résistance. Pour étudier les phénomènes de résistance acquis dans un contexte thérapeutique, un modèle original de neuroblastome résistant à l'irinotecan (CPT-11) a été développé *in vivo*. Des souris nude immunodéficientes ont été transplantées avec un prélèvement chirurgical issu d'un patient atteint d'un neuroblastome de mauvais pronostic (une tumeur de stade 3 (ancien stade

M), diagnostiquée chez un patient âgé de 5 ans et réfractaire aux traitements conventionnels). La xénogreffe obtenue, IGR-NB8 a montré une forte sensibilité initiale au CPT-11 (environ 50% de régression complète (volume tumoral < 15 mm<sup>3</sup>) et partielle (volume tumoral < 50% du volume initial)). La xénogreffe a été entretenue *in vivo* et traitée de façon régulière et séquentielle (entre 2 et 4 cycles de CPT-11 de 5 jours chacun, répétés tous les 14 jours). Au fur et à mesure des passages *in vivo* la xénogreffe a acquis un phénotype résistant au CPT-11 (plus de régression totale ou partielle à partir du passage 6 et augmentation des délais de croissance tumorale) (Figure 24).

### Comparaison des délais de croissance tumorale entre les groupes contrôles et traités au CPT-11



**Figure 24** – Evolution des volumes tumoraux moyens au cours de 28 passages *in vivo*. Les animaux ont été traités par du NaCl (contrôle, trait noir) ou du CPT-11 (27 mg/kg, traits bleus pour IGR-NB8, traits rouges pour IGR-NB8-R et traits verts pour IGR-NB8-r). Les flèches représentent un cycle de traitement (une injection de CPT-11 par jour pendant 5 jours). (Inspiré de Calvet et al., 2004).

Cette tumeur a été nommée IGR-NB8-R. Des travaux antérieurs menés à partir de ce modèle ont permis la publication de deux articles (Calvet et al., 2004 ; Calvet et al., 2006), décrivant plus en détail le développement et la caractérisation phénotypique du modèle de résistance

(IGR-NB8-R). Il est important de retenir que la résistance obtenue dans ce modèle est réversible et n'implique aucun des principaux mécanismes « classiquement » décrits pour les inhibiteurs de topoisomérase I (cf **partie 2**, II, 3). Notamment, la topoisomérase I ne présente pas d'altération en termes de séquence, d'expression protéique ou d'activité catalytique. Les principales pompes d'efflux, prenant en charge les inhibiteurs de topoisomérase I (MDR1, MRP1 et BCRP) ne sont pas sur-exprimées. Il faut également noter que même si le CPT-11 n'induit pas d'apoptose dans la xénogreffe résistante, les mécanismes de mort cellulaire restent fonctionnels dans la tumeur puisqu'une absence de résistance croisée avec des agents chimiothérapeutiques d'autres classes (les agents alkylants et platinants) a pu être démontrée. En revanche, IGR-NB8-R a montré une résistance croisée avec le topotecan, un autre inhibiteur de topoisomérase I.

Pour identifier des mécanismes « originaux » associés à la résistance au CPT-11 dans le modèle, différentes approches ont été suivies.

Tout d'abord, pour comparer l'expression des gènes dans les tumeurs sensibles et résistantes, deux études génomiques successives ont été menées sur différentes puces à ADN (les premières, développées par Clontech<sup>®</sup> contenaient 588 gènes en rapport avec le cancer et les secondes étaient des puces Agilent<sup>®</sup> 22K). La première étude a révélé une sous-expression majeure de PTN dans les tumeurs résistantes (Calvet et al., 2006). Lors de cette étude l'implication de PTN dans le contrôle du phénotype sensible/résistant de la xénogreffe a été évaluée. PTN est un facteur de croissance impliqué dans le contrôle de l'angiogénèse *in vivo*, en revanche son rôle exact est controversé et différentes études rapportent son rôle dans l'inhibition mais aussi dans l'induction de l'angiogénèse. De façon intéressante, l'étude menée a montré que la densité vasculaire était significativement augmentée dans les tumeurs résistantes au CPT-11 par rapport aux tumeurs sensibles. Ainsi PTN pourrait agir comme un facteur anti-angiogénique dans les tumeurs sensibles. A l'inverse, la diminution de son expression dans les tumeurs résistantes serait corrélée à une augmentation de l'angiogénèse et pourrait participer à l'acquisition d'un phénotype plus agressif et résistant au CPT-11.

Plus tard, la seconde étude génomique (Regairaz et al., données non publiées) a confirmé cette dérégulation de PTN et mis en évidence une sur-expression de la protéine ALK, décrite comme un récepteur potentiel de PTN. De façon intéressante, ALK possède un second ligand,

MDK. De façon remarquable, l'expression de MDK reste stable entre les tumeurs sensibles et résistantes. Cette protéine présente 50% d'homologie avec PTN et représente une cible prometteuse dans le cancer et particulièrement dans le neuroblastome. L'expression de MDK est fréquente dans les tumeurs neuroblastiques et corrèle avec un mauvais pronostic (Nakagawara et al., 1995). Ainsi, nous avons montré que l'expression des acteurs de la voie de signalisation ALK-PTN-MDK est remaniée au cours de l'acquisition de la résistance (Table 8). De l'ensemble de ces travaux est né le premier axe de travail, présenté dans cette thèse, visant à décortiquer le rôle de ALK et de MDK dans la pathogénèse du neuroblastome.

	<u>ALK</u>	<u>PTN</u>	<u>MDK</u>
<u>IGR-NB8</u>	<u>+</u>	<u>+++</u>	<u>++</u>
<u>IGR-NB8-R</u>	<u>+++</u>	<u>+</u>	<u>++</u>

**Table 8** – Intensité d'expression des acteurs de la voie de signalisation ALK dans les tumeurs sensibles et résistantes au CPT-11.

Dans un premier temps, nous avons exploré l'implication de ALK dans la physiopathologie du neuroblastome. Ce travail a fait l'objet d'une publication (soumise), en tant que deuxième auteur : **Mutation-independent activation of the Anaplastic Lymphoma Kinase in neuroblastoma** (Regairaz et al).

En second temps, nous avons évalué le rôle de MDK dans la régulation de ALK et dans le contrôle de la survie et de la prolifération dans le neuroblastome. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication (soumise), en tant que premier auteur : **MDK signals through ALK and other receptors to promote the survival of neuroblastoma cells** (Munier et al.).

D'autre part, une caractérisation mécanistique du modèle de résistance a été menée en parallèle. Il s'agit d'une étude comparée des évènements associés spécifiquement à la réponse cellulaire après administration de CPT-11 dans les tumeurs sensibles (IGR-NB8) et résistantes (IGR-NB8-R) qui constitue le second axe de travail, présenté dans la thèse.

Ces données ont permis de rédiger un article, en tant que premier auteur qui sera soumis prochainement : **Acquired *in vivo* resistance to irinotecan in neuroblastoma is associated with genetic instability and quiescence** (Munier et al.)

La thèse est structurée ainsi :

Une partie « Résultats », divisée selon deux axes de recherche,

- **Etude de la voie de signalisation gouvernée par ALK et son ligand MDK** (rédigé sous forme de deux articles scientifiques en anglais)
- **Caractérisation phénotypique du modèle de résistance suite à l'injection d'irinotecan** (rédigé sous forme d'un article scientifique en anglais)

Enfin une discussion générale en français.

## **RESULTATS**

### **Partie . 1 Etude de la voie de signalisation ALK-MDK**

#### **Présentation de l'article 1 : Mutation-independent activation of the Anaplastic Lymphoma Kinase in neuroblastoma**

Après la mise en évidence de la sur-expression de ALK dans notre modèle de neuroblastome résistant, et suite à la découverte par d'autres équipes de mutations activatrices de ALK dans des tumeurs neuroblastiques primaires, nous avons cherché à mieux définir le rôle de cette protéine dans la physiopathologie du neuroblastome.

Par le biais de marquages immunohistochimiques, nous avons évalué la fréquence et l'intensité d'expression de ALK, de sa forme phosphorylée (phospho-ALK) et de ses ligands (PTN et MDK). Nous avons ensuite évalué la capacité de chacun des ligands, PTN et MDK à activer ALK dans des lignées cellulaires. Enfin, nous avons réalisé l'inhibition pharmacologique de phospho-ALK, par un inhibiteur spécifique (le TAE684) dans des lignées et xénotreffes neuroblastiques présentant différents statuts géniques de ALK.

Les données obtenues ont permis de mettre en évidence une modification de l'expression des acteurs de la voie de signalisation ALK-PTN-MDK durant l'oncogénèse du neuroblastome. Nous avons notamment montré l'activation fréquente de ALK (dans 50% des tumeurs), la sur-expression de MDK et à l'inverse la diminution de l'intensité d'expression de PTN dans les tumeurs neuroblastiques par rapport aux tissus sains appariés. De façon remarquable, l'activation de ALK est détectée plus fréquemment dans les cas favorables. La fréquence d'activation de ALK est largement supérieure à la fréquence des mutations activatrices de

ALK et prouvent que des mécanismes alternatifs sont à l'origine de l'activation de ALK dans une majorité de cas. Nous avons montré que MDK est fréquemment exprimé (80% des tumeurs) et que cette protéine est capable d'activer ALK, contrairement à PTN. Finalement, l'inhibition de phospho-ALK a permis d'obtenir une diminution de la viabilité cellulaire *in vitro*, plus importante dans les lignées présentant une mutation de ALK. En revanche les effets sur la viabilité cellulaire semblent indépendants de l'intensité d'expression de ALK. *In vivo*, l'inhibition de phospho-ALK a entraîné une diminution importante de la croissance tumorale dans des xéogreffes exprimant la mutation R1275Q alors qu'aucun effet anti-tumoral n'a été obtenu dans des xéogreffes sauvages pour ALK ou portant la mutation F1174L.

L'ensemble de ces données montre que l'activation de ALK survient majoritairement par des mécanismes alternatifs aux mutations et est un événement participant plutôt à l'oncogénèse du neuroblastome qu'à sa progression. L'inhibition de phospho-ALK semble efficace uniquement sur un sous-type de neuroblastome, sur les tumeurs exprimant la mutation R1275Q.

## **I. Article 1: Mutation-independent activation of the Anaplastic Lymphoma Kinase in neuroblastoma**

Marie Regairaz<sup>1</sup>, Fabienne Munier<sup>1</sup>, Hervé Sartelet<sup>1,2</sup>, Marine Castaing<sup>3</sup>, Virginie Marty<sup>4</sup>, Céline Renauleaud<sup>1</sup>, Camille Doux<sup>1</sup>, Jean Delbé<sup>5</sup>, José Courty<sup>5</sup>, Monique Fabre<sup>6</sup>, Stéphane Barrette<sup>2</sup>, Marie-Pier Arsenault<sup>2</sup>, Shigeru Ohta<sup>7</sup>, Stefan Michiels<sup>3</sup>, Dominique Valteau-Couanet<sup>8</sup>, and Gilles Vassal<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Vectorology and Anticancer Therapeutics, Gustave Roussy Institute, University Paris-Sud, CNRS UMR 8203, Villejuif, France ; <sup>2</sup> Sainte Justine University Hospital Center, University of Montréal, Montréal, Québec, Canada ; <sup>3</sup> Department of Biostatistics and Epidemiology, Gustave Roussy Institute, Villejuif, France ; <sup>4</sup> Histocytopathology Unit, Laboratory of Translational Research, Gustave Roussy Institute, Villejuif, France ; <sup>5</sup> Research on Cell Growth, Tissue Repair and Regeneration (CRRET), EAC 7149 CNRS, University Paris-Est Créteil, Créteil, France ; <sup>6</sup> Department of Pathology, Bicêtre Hospital, Le Kremlin-Bicêtre, France ; <sup>7</sup> Department of Pediatrics, Shiga University of Medical Science, Otsu, Shiga, Japan ; <sup>8</sup> Department of Pediatrics, Gustave Roussy Institute, Villejuif, France

Running title: ALK activation in neuroblastoma

Keywords: Neuroblastoma, Anaplastic Lymphoma Kinase, Midkine, Pleiotrophin, TAE684.

## ABSTRACT

**Purpose:** Activating mutations of the Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) have been identified as important players in neuroblastoma development. The objective of this study was to analyze overall ALK activation using a phospho-ALK antibody and to assess the relevance of ALK as a therapeutic target in neuroblastoma.

**Experimental Design:** Expressions of phospho-ALK, ALK and its ligands, pleiotrophin and midkine, were screened in 289 neuroblastomas and 56 paired normal tissues. Antitumor activity of the ALK inhibitor TAE684 was evaluated in wild-type or mutated ALK neuroblastoma cell lines and xenografts.

**Results:** ALK was expressed in 99% of tumors and phosphorylated in 48% of cases. Pleiotrophin and midkine were expressed in 58% and 79% of tumors, respectively. ALK phosphorylation/activation was largely independent of mutations and correlated with midkine expression in tumors. Wild-type ALK over-expression induced ALK signaling in midkine+ neuroblastoma cells.

ALK activation was significantly higher in tumors than in paired normal tissues ( $p=0.0007$ ), together with ALK and midkine expressions ( $p<0.0001$ ). ALK activation in tumors was associated with favorable features, including a younger age at diagnosis ( $p=0.0006$ ), absence of cell diploidy ( $p=0.006$ ) and detection by mass screening ( $p<0.0001$ ).

TAE684 was cytotoxic *in vitro* in all neuroblastoma cell lines, with the lowest IC50s observed in ALK mutated lines. *In vivo*, TAE684 showed no antitumor activity against wild-type and F1174I xenografts but was potent against R1275Q xenografts.

**Conclusions:** ALK activation occurs frequently during neuroblastoma oncogenesis, mainly through mutation-independent mechanisms. However, only a small subset of neuroblastoma patients (R1275Q cases) may benefit from current ALK inhibitors.

## 1. Introduction

Neuroblastoma is a pediatric malignancy derived from primitive cells of the sympathetic nervous system and is one of the most common tumor in childhood. Prognosis of neuroblastoma is remarkably variable, ranging from favorable neuroblastomas that can



regress spontaneously to unfavorable neuroblastomas that are refractory to treatment, even intensive chemotherapy(1, 2). Biological events underlying neoplastic transformation of normal neuroblastic cells and their subsequent commitment into one of these two forms of the disease are still poorly understood. Recently, the Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) receptor has been reported to be a potential key player in both neuroblastoma initiation and progression(3-8). Oncogenic mutations of ALK could be responsible for most familial neuroblastoma cases(3, 4) and could also account for 5 to 15% of somatic neuroblastoma cases(3-7, 9, 10). ALK chromosomal abnormalities are involved in the pathogenesis of a number of malignancies and include translocations (resulting in the formation of ALK fusion proteins), amplifications and tyrosine-kinase domain mutations(11, 12). Translocations have been described in Anaplastic Large Cells Lymphomas, Non-Small-Cell Lung Cancers and Inflammatory Myofibroblastic Tumors(11, 12). ALK amplifications and point mutations are detected in neuroblastomas(3-13). ALK genomic alterations are associated with constitutive ALK kinase activation(3-6, 14, 15) and confer sensitivity to ALK inhibitors(11, 12, 16). ALK activation can also be triggered by two different ligands: pleiotrophin (PTN)(17) and midkine (MDK)(18), two heparin-binding growth factors sharing 50% of homology(19, 20). Interestingly, these cytokines are both expressed in neuroblastoma(21, 22). Here, we hypothesized that ALK activation in neuroblastoma could occur independently of mutations as well, and participate in the development and/or the progression of the disease in many more sporadic cases than those presenting ALK mutations. We present the first analysis of ALK activation in neuroblastoma tumors using an antibody against phosphorylated ALK (P-ALK). We also evaluate the antitumor activity of the ALK inhibitor TAE684 in neuroblastoma cell lines and xenografts.

## **2. Patients and methods**

### **Patients**

Paired normal tissue and neuroblastoma samples were obtained from 289 patients who were treated and followed at Hôpital Bicêtre/Institut Gustave Roussy (Le Kremlin-Bicêtre/Villejuif, France), American Hospital (Reims, France), CHU Sainte-Justine (Montréal, Canada) and Shiga University of Medical Science (Otsu, Japan). These patients were diagnosed between July 1988 and March 2008. Fifty-five patients were detected by mass screening. This study

was approved by the institutional review boards at each of the participating centers, and informed consent was obtained from the children's parents.

Tumors were classified according to the International Neuroblastoma Staging System (INSS)(23). Clinical characteristics of patients are summarized in table 1.

### **Tissue microarray construction and immunohistochemistry**

All specimens were embedded in paraffin and examined after haematoxylin/eosin staining. A viable and representative area of each specimen was sampled in quadruplicate into a recipient paraffin block using a tissue-arrayer (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI). Nine tissue microarray (TMA) blocks were constructed containing 289 primary neuroblastomas and 56 paired normal tissues (adrenal gland or sympathetic ganglia). TMA sections were immunostained with anti-ALK (#18-0266, Invitrogen, Carlsbad, CA), anti-P-ALK (#3341, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), anti-PTN or anti-MDK (#AF-252-PB and #AF-258-PB, R&D Systems, Minneapolis, MN) antibodies. Samples were scored semi-quantitatively using the percentage of positive cells (0 = no labeling, 1+ = 1 to 25% of positive cells, 2+ = 26 to 50% of positive cells, 3+ = 51 to 75% of positive cells and 4+ = more than 76% of positive cells).

### **Cell lines and transfections**

Nine human neuroblastoma cell lines derived from patients with advanced stages of disease were used: IMR-32, LAN-1, LAN-5, IGR-N91, IGR-NB8, NJB, SH-SY5Y, SK-N-AS and SK-N-BE(2)(24-26). All cells were grown in T25 flasks under standard cell culturing conditions.

Cells seeded in 6-well plates were transfected with pcDNA3 or pcDNA3-ALK plasmids using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Transfectants were selected with G418 until colony formation and G418-resistant clones were screened for ALK expression.

### **ALK sequencing**

Total RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) and reverse-transcribed using the Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). The resulting cDNA was used to amplify the tyrosine-kinase domain of ALK by polymerase chain reaction (PCR).

PCR products were sequenced bidirectionally on an ABI 3730 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers are available on request.

### **RPTP $\beta$ / $\zeta$ expression**

Total RNA was extracted and reverse-transcribed as described above. A 240 bps coding region of RPTP $\beta$ / $\zeta$  was amplified with the following primers: 5'-GACCGTCTGGAAATGCGAAT-3' and 5'-TGAAACTCCTCCGCTGACA-3'. Total RNA from human U373 glioblastoma cells was used as a positive control. An ACTB ( $\beta$ -actin) PCR was performed to verify RNA/cDNA integrity (using primers 5'-TTCCTTCTGGGCATGGAGT-3' and 5'-TCCTGCTTGCTGATCCACAT-3'). PCR products were visualized after agarose gel electrophoresis.

Expression profiling analysis was performed using the publicly available Pediatric Xenograft & Tumor Gene Expression Database(27) (<http://pob.abcc.ncifcrf.gov/cgi-bin/JK>). The database was searched by querying PTPRZ1 (gene symbol for RPTP $\beta$ / $\zeta$ ). Output median-centered log<sub>2</sub> ratios were retrieved to build a bar-chart.

### **Cell viability assay**

TAE684 was kindly provided by Novartis (Johannes Roesel). Cells were seeded in 96-well plates to reach 30% of confluency at the time of treatment. Cell viability was measured by MTT assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) following 72 hours of continuous exposure to TAE684.

### ***In vivo* experiments**

IGR-NB8 (wild-type ALK) and IGR-N835 (F1174I ALK) xenografts have been previously established at Gustave Roussy Institute(26, 28). The CLB-GA cell line (R1275Q ALK)(24) was kindly provided by Valérie Combaret (Centre Léon Bérard, Lyon, France). IGR-NB8 and IGR-N835 xenografts (15-30 mm<sup>3</sup> fragments) or CLB-GA cells (107) were implanted subcutaneously in 6-8 week-old female Swiss athymic mice. Animals bearing a 100–300 mm<sup>3</sup> tumor were randomized into control or treatment groups (n=5). The vehicle solution or TAE684 (1, 3 or 10 mg/kg) were administered *per os* once daily during 3 weeks. Tumor volumes were measured twice weekly. Experiments were carried out under the conditions established by the European Union (directive 86/609/CEE).

## **Western-blotting**

Cell pellets or frozen tumors were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% NP-40, supplemented with proteases and phosphatases inhibitors) before clearing by centrifugation. Secreted PTN and MDK proteins were recovered from cell culture media by heparin-sepharose purification(29). Proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis and immunoblotted with the following antibodies: anti-PTN, anti-MDK (R&D Systems), anti-ALK (Invitrogen), anti-P-ALK, anti-STAT3, anti-P-STAT3, anti-AKT, anti-P-AKT, anti-MAPK, anti-P-MAPK (Cell Signaling Technology) and anti- $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich).

## **Statistical analysis**

A median immunostaining score was calculated for each specimen and each marker. Correlations between markers were evaluated with Spearman's correlation coefficient. The Wilcoxon signed-rank test was applied for the comparison of paired data. Association of P-ALK with prognostic factors was assessed using the Mann-Whitney test. All analyses were conducted with SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC). P values were based on a two-sided hypothesis and were considered statistically significant when less than .05.

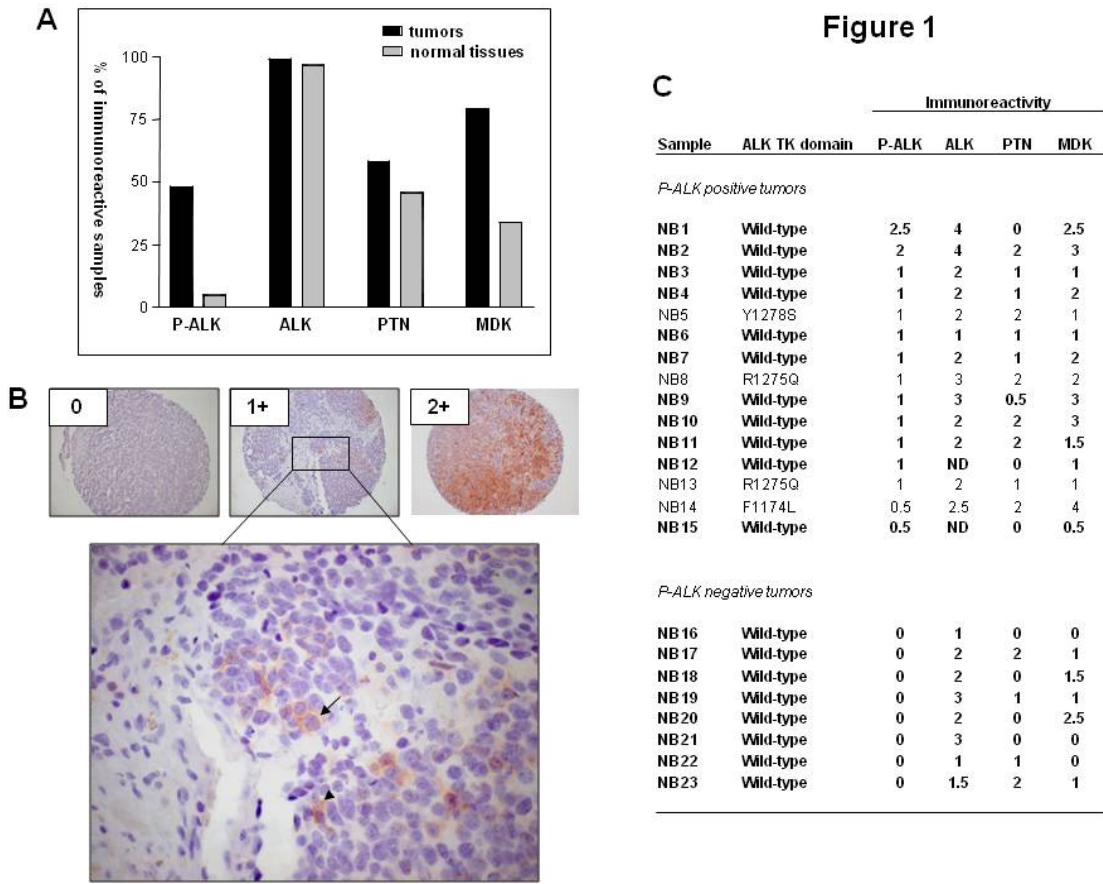
## **3. Results**

### **ALK activation is frequent and mostly independent of mutations in neuroblastoma**

To determine the real frequency of ALK activation in neuroblastoma, we analyzed the expression and activation of the receptor in 234 primary tumors using antibodies directed against total or phosphorylated ALK. We found that ALK was expressed in 99% of tumors and phosphorylated (i.e. activated) in 48% of tumors (figure 1A). Both ALK and P-ALK immunoreactivities were mostly cytoplasmic with occasional membrane staining (figure 1B), consistent with ALK localization(30). ALK and P-ALK immunostaining scores also tended to be positively correlated (Spearman correlation value  $\rho=0.12$ ,  $p=0.06$ ). Among P-ALK positive tumors, 78%, 16%, 5%, and 1% of cases had an immunostaining score of 1+, 2+, 3+, and 4+, respectively (figure 1B).

Because the proportion of neuroblastic tumors showing ALK activation was much higher than that described for the occurrence of ALK activating mutations in neuroblastoma(3-7, 9, 10),

we next sequenced the tyrosine-kinase domain of ALK in a subset of P-ALK positive or negative specimens. Four out of 23 analyzed tumors showed single-nucleotide substitutions leading to previously reported mutations(3-7, 9, 10) (figure 1C). Remarkably, all ALK mutated tumors were P-ALK positive (figure 1C), suggesting that kinase domain mutations systematically lead to ALK activation in tumors. However, the majority of P-ALK positive tumors (11 out of 15) were expressing a wild-type ALK receptor, demonstrating that ALK activation is mostly independent of mutations in neuroblastoma (figure 1C).



**Figure 1** – Characterization of ALK activation in neuroblastoma. (A) Detection of P-ALK, ALK, PTN, and MDK in neuroblastic tumors and sympathetic normal tissues. Immunoreactive samples are those with an immunostaining score  $\neq 0$ . (B) Representative P-ALK staining patterns (immunostaining score = 0, 1+ or 2+). Arrow and arrowhead indicate membrane and cytoplasmic P-ALK localizations, respectively. Magnification x250 (upper pictures) and x630 (lower picture). (C) ALK mutation analysis in P-ALK positive or negative neuroblastoma specimens.

### **MDK triggers mutation-independent activation of ALK in neuroblastoma**

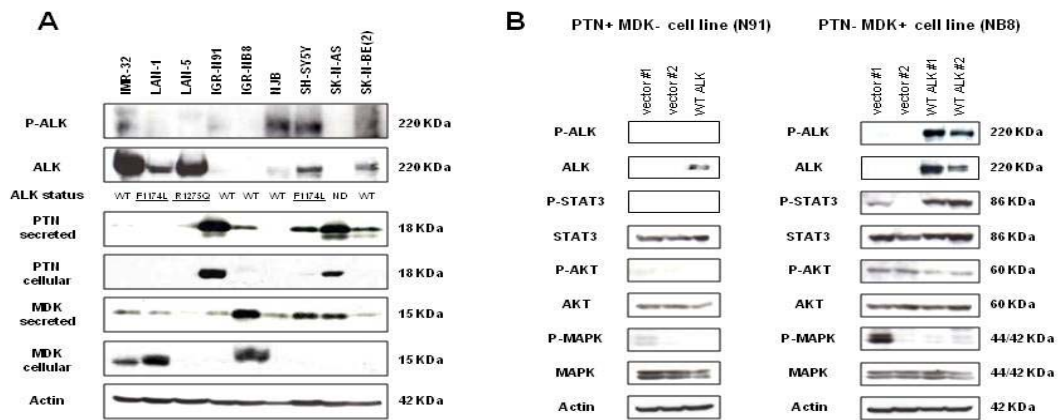
To gain further insights into the mechanisms underlying mutation-independent activation of ALK in neuroblastoma, we examined the potential involvement of the two reported ALK ligands, pleiotrophin (PTN) and midkine (MDK), in this process. We first analyzed PTN and MDK expression in tumors and we found that both proteins were largely expressed in neuroblastoma, with 58% of PTN positive and 79% of MDK positive samples (figure 1A).

Strikingly, ALK phosphorylation was positively correlated with MDK expression (Spearman  $\rho=0.17$ ,  $p=0.006$ ) but not with PTN expression ( $\rho=0.07$ ,  $p=0.30$ ), suggesting that MDK only is able to drive ALK activation in neuroblastoma. Most interestingly, MDK was expressed in all wild-type ALK/P-ALK+ tumors (figure 1C).

In neuroblastoma cell lines, the expression and/or the secretion of PTN and MDK were detected in 60% and 90% of cell lines, respectively (figure 2A). No ALK mutations were found in 3 out of 4 P-ALK positive cell lines. These wild-type ALK/P-ALK+ cell lines (IMR-32, NJB, and SK-N-BE) showed expression and/or secretion of MDK (figure 2A). To further confirm that a wild-type ALK receptor could be activated in neuroblastoma cells, ALK negative neuroblastoma cell lines expressing either PTN (IGR-N91) or MDK (IGR-NB8) (figure 2A) were stably transfected with a wild-type ALK encoding vector. After selection of G418-resistant clones, ALK expression and activation were analyzed by western-blot. When expressed in IGR-N91 (PTN+) cells, ALK remained under its unphosphorylated form and no change in downstream signaling was observed (figure 2B). Conversely, ALK expression in IGR-NB8 (MDK+) cells was associated with ALK phosphorylation and downstream activation of STAT3 (figure 2B).

Altogether, these data suggest that MDK but not PTN can activate ALK in neuroblastoma cells.

**Figure 2**

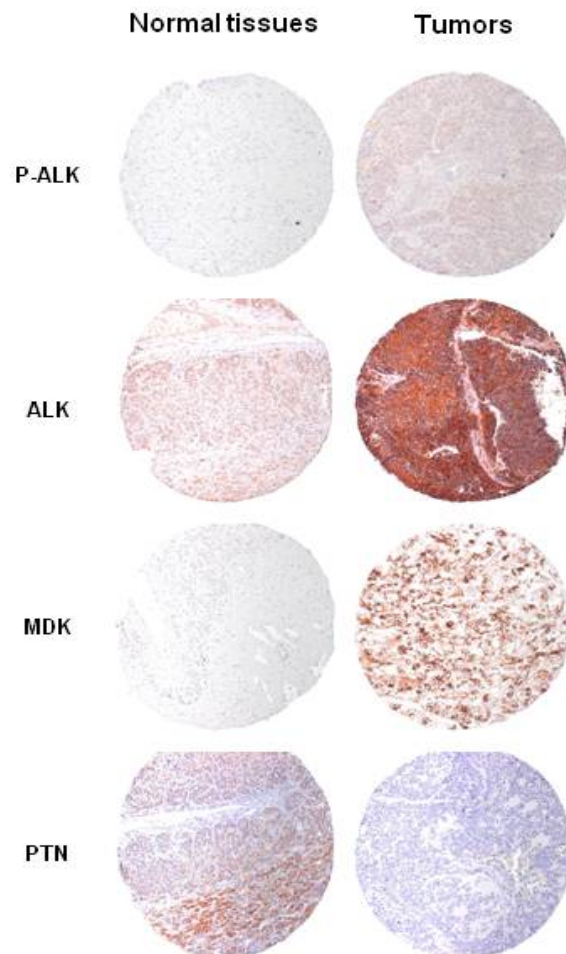


**Figure 2 – Effect of PTN and MDK ligands on ALK activation in neuroblastoma cell lines.** (A) ALK mutation analysis and western-blot analysis of P-ALK, ALK, PTN, and MDK expressions in a panel of nine human neuroblastoma cell lines. WT, wild-type; ND, not determined. Actin was used as a loading control. (B) Western-blot analysis of ALK activation and downstream signaling in IGR-N91 (PTN+) or IGR-NB8 (MDK+) cells, stably transfected with a wild-type ALK expression vector (WT ALK) or with the corresponding empty vector (vector). #1 and #2 indicate different clones. Actin was used as a loading control.

### ALK activation correlates with a neoplastic but not with an aggressive phenotype in neuroblastoma

To determine whether ALK activation could participate in neuroblastoma initiation, we next compared ALK phosphorylation between normal tissues and tumors. We found that ALK was expressed in 97% of normal tissues (as compared to 99% of tumors) while a P-ALK staining was observed in only 5% of normal tissues (versus 48% of tumors) (figure 1A). Furthermore, comparison of immunostaining scores between paired tumors and normal tissues (n=56 pairs) showed that ALK was both activated (p=0.0007) and over-expressed (p<0.0001) in tumors as compared to normal tissues (figure 3).

**Figure 3**



**Figure 3 – P-ALK, ALK, MDK, and PTN levels in paired sympathetic normal tissues and neuroblastic tumors.** Representative photomicrographs of paired tissues are shown for each immunostaining (magnification x250).

To better understand the appearance of ALK activation in tumors, we also compared the expression of ALK ligands between normal tissue and neuroblastoma samples. MDK was expressed in 34% of normal tissues (versus 79% of tumors), while PTN was detected in 46% of normal tissues (versus 58% of tumors) (figure 1A). Comparison of paired data showed that MDK was expressed at higher levels in tumors as compared to paired normal tissues ( $p < 0.0001$ ) while PTN showed an inverse tendency, being more expressed in normal tissues ( $p = 0.07$ ) (figure 3).



To determine whether ALK activation was related to prognosis in neuroblastoma, we next analyzed the association of the P-ALK marker with clinical/biological variables. We found that ALK activation was significantly associated with good-prognosis factors including a younger age at diagnosis ( $p=0.0006$ ) and absence of cell diploidy ( $p=0.006$ ) (table 1).

**Table 1. Clinical characteristics of patients**

**Standard neuroblastomas (n=234)**

<b>Characteristic</b>	<b>No. of patients</b>	<b>%</b>
<b>Sex</b>		
male	114	48.7
female	120	51.3
<b>Age (months)</b>		
median	25	
range	0-183	
< 18 months	102	43.6
>= 18 months	132	56.4
<b>Stage<sup>a</sup></b>		
1	52	22.2
2	32	13.7
3	35	15.0
4	97	41.4
4S	18	7.7
<b>MYCN status (n=190)</b>		
< 10 copies	156	82.1
>= 10 copies	34	17.9
<b>Ploidy (n=83)</b>		
Non-diploid	51	61.4
Diploid	32	38.6

**Mass screened neuroblastomas (n=55)**

<b>Characteristic</b>	<b>No. of patients</b>	<b>%</b>
<b>Sex</b>		
male	29	52.7
female	26	47.3
<b>Age (months)</b>		
median	8	
range	1-14	
< 18 months	55	100.0
>= 18 months	0	0.0
<b>Stage<sup>a</sup></b>		
1	16	29.1
2	15	27.2
3	9	16.4
4	6	10.9
4S	9	16.4
<b>MYCN status</b>		
< 10 copies	54	98.2
>= 10 copies	1	1.8

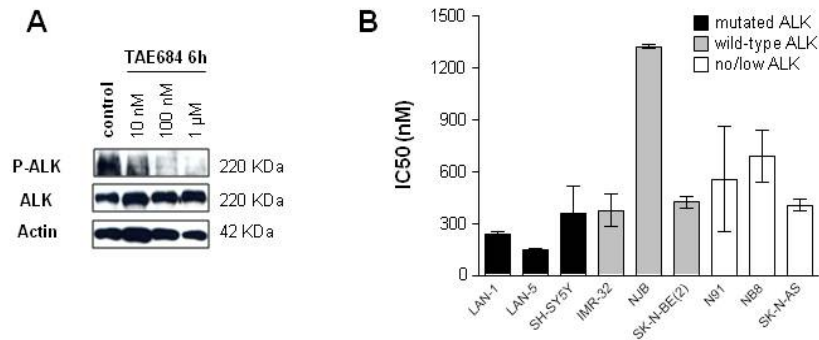
<sup>a</sup> According to the International Neuroblastoma Staging System classification

However, overall survival was not significantly different between patients with P-ALK negative and P-ALK positive tumors (HR=0.8; p=0.39). To further verify that ALK activation was associated with good-prognosis in neuroblastoma, we examined P-ALK staining in a series of 55 neuroblastomas detected by mass screening. Mass screening programs have been initiated in several countries to detect neuroblastoma in infants and improve the outcome of the disease. However, these programs have shown that tumors detected by mass screening almost invariably exhibit favorable features (31, 32)). As expected, ALK was activated more frequently in mass screened neuroblastomas than in standard tumors (84% versus 48% of P-ALK positive samples). P-ALK levels were also higher in mass screened tumors (p<0.0001) (supplemental figure 1B, annexes). Overall, ALK is thus more activated in favorable than in unfavorable neuroblastoma cases.

### **Pharmacological inhibition of ALK**

To further assess the relevance of ALK activation in neuroblastoma and to determine whether ALK targeting could represent a therapeutic option in this disease, we examined the consequences of ALK kinase inhibition in neuroblastoma cell lines and xenografts by the small ALK inhibitor TAE684(33). TAE684 activity was first evaluated in vitro in a panel of nine neuroblastoma cell lines expressing either a wild-type or a mutated ALK receptor and presenting various levels of the total and phosphorylated forms of the protein (figure 2A). Exposure of the P-ALK positive SH-SY5Y cell line (expressing a F1174L mutant of ALK) to TAE684 for 6 hours confirmed that ALK phosphorylation was inhibited by the drug in a dose-dependent manner (figure 4A). After 72 hours of exposure to the drug, inhibition of cell proliferation by TAE684 was observed in all neuroblastoma cell lines, with IC50s ranging from 150 nM to 1.3  $\mu$ M (figure 4B). All three ALK-mutated cell lines, as well as two of the three wild-type phosphorylated ALK cell lines (IMR-32 and SK-N-BE(2)) were the most sensitive to TAE684 (IC50s < 500 nM).

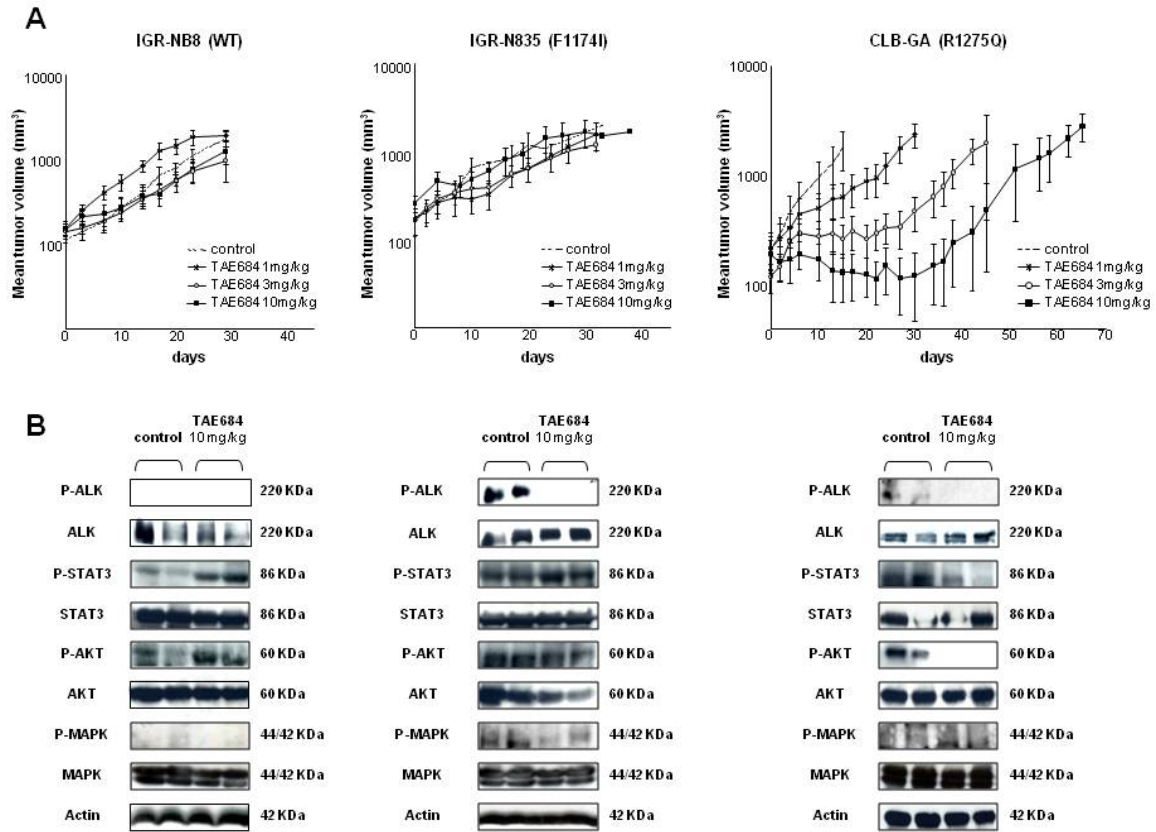
**Figure 4**



**Figure 4 – Pharmacological inhibition of ALK in neuroblastoma cell lines.** (A) Western blot showing the inhibition of ALK phosphorylation by TAE684 in the SH-SY5Y (F1174L ALK) cell line. Actin was used as a loading control. (B) Sensitivity to TAE684 in neuroblastoma cell lines expressing a mutated ALK (black bars), a wild-type ALK (grey bars) or no ALK (white bars). Mean IC<sub>50</sub> values ± SEM from duplicate experiments are shown.

TAE684 activity was next evaluated *in vivo* in three neuroblastoma xenografts. Athymic mice bearing either a wild-type (IGR-NB8) or a mutated ALK (IGR-N835 or CLB-GA) neuroblastoma tumor were administered vehicle solution or TAE684 at 1, 3 or 10 mg/kg/day during 21 consecutive days. The compound was well tolerated up to the maximal dose of 10 mg/kg/day since maximal body weight loss did not exceed 10% on average and no toxic deaths were observed (supplemental table 1, annexes). A strong inhibition of ALK phosphorylation was observed in both IGR-N835 and CLB-GA after 3 days of TAE684 treatment at 10 mg/kg/day (figure 5B). No such inhibition could be confirmed in IGR-NB8 since no P-ALK signal was detectable in these tumors at basal level (figure 5B). Despite being used at *in vivo* pharmacologically active doses, TAE684 failed to show antitumor activity against both IGR-NB8 (wild-type ALK) and IGR-N835 (F1174I ALK) xenografts. However, TAE684 proved to be very potent against the CLB-GA (R1275Q ALK) xenograft (figure 5A). Remarkably, TAE684 induced CLB-GA tumor growth delay in a dose-dependent manner (figure 5A). Moreover, two complete regressions and one tumor-free survivor were observed at the maximal dose of 10 mg/kg/day (supplemental table 1, annexes). Antitumor activity of TAE684 was correlated with abrogation of ALK downstream signaling since P-STAT3 and P-AKT levels were greatly reduced in CLB-GA xenografts after 3 days of treatment (figure 5B). Conversely, no inhibition of ALK downstream effectors was observed in the TAE684-resistant (IGR-NB8 and IGR-N835) xenografts (figure 5B).

**Figure 5**



**Figure 5 – *In vivo* activity of the small-molecule ALK inhibitor TAE684 against neuroblastoma xenografts with different ALK mutation status.** (A) Evolution of tumor growth in IGR-NB8 (wild-type ALK), IGR-N835 (F1174I ALK), and CLB-GA (R1275Q ALK) neuroblastoma xenografts treated with vehicle solution or TAE684 at 1, 3 or 10 mg/kg/day during 21 days. Mean tumor volumes  $\pm$  SEM are shown. (B) Western-blot analysis of ALK activation and ALK downstream signaling in neuroblastoma xenografts treated with TAE684 at 10 mg/kg/day during 3 days. Two individual tumors were analyzed. Actin was used as a loading control.

#### 4. Discussion

Identification of the Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) as the major familial neuroblastoma predisposition gene(3) has shown that activation of this kinase is probably a key event in neuroblastoma pathogenesis and has also provided a molecular rationale for targeted therapy using ALK-specific inhibitors in this disease. The ALK gene encodes a receptor tyrosine-kinase expressed primarily in the developing nervous system(34, 35). In tumors, ALK fusion proteins are found in a variety of cancers(11, 12) whereas full-length ALK is expressed almost exclusively in tumors of neuroectodermal origin, especially in neuroblastomas(36-38). In the present study, we confirmed that ALK is ubiquitously

expressed in neuroblastoma specimens and we further showed that ALK is frequently activated in these tumors (48% of cases).

The molecular mechanisms underlying ALK activation in neuroblastoma are still largely unknown. Mutations in the tyrosine-kinase domain of ALK have been reported in 5 to 15% of sporadic neuroblastoma cases(3-7, 9, 10) and have been shown to constitutively activate the receptor *in vitro*(3-6, 39). Here, we showed that these mutations are indeed observed only in P-ALK positive specimens but we also demonstrated that ALK activation is mainly independent of mutations in neuroblastoma.

In accordance with previous studies(21, 22), we found that the two postulated ALK ligands, pleiotrophin (PTN)(17) and midkine (MDK)(18), are frequently expressed in neuroblastoma (in 58% and 79% of tumors, respectively) and are thus likely to represent a major mechanism of ALK activation in neuroblastoma. Several observations indicated that at least MDK is able to trigger ALK activation in neuroblastoma. First, ALK phosphorylation is correlated with MDK expression in tumors. Second, ALK activation and over-expression in tumors (as compared to normal tissues) is concomitant with MDK up-regulation. Finally, over-expression of a wild-type ALK receptor results in the induction of ALK signaling in a MDK-expressing (but not in a PTN-expressing) neuroblastoma cell line. These findings are consistent with independent studies showing that MDK could serve as a physiological ligand for ALK in different cell types, including sympathetic neurons (18, 40, 41). On the other hand, PTN ability to activate ALK has been controversial(17, 42-44). An attractive model reconciling these data proposed that ALK activation by PTN occurs through an “alternative mechanism of RTK activation” via the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta (RPTP $\beta$ / $\zeta$ )(45). Interestingly, RPTP $\beta$ / $\zeta$  expression is very low in neuroblastoma (supplemental figure 2, annexes), explaining why PTN could fail to activate ALK in neuroblastic cells.

The frequency of ALK activation in neuroblastoma raises the question of its biological role in this malignancy. Activating mutations of the ALK receptor have been shown 1) to occur in 80% of familial neuroblastoma cases(3, 4) and 2) to confer a transforming potential to the ALK kinase(5, 6), indicating that ALK activation might play a role in neuroblastoma oncogenesis. Supporting this hypothesis, we found that ALK is differentially phosphorylated between matched normal sympathetic tissues and neuroblastic tumors. ALK activation could therefore represent a major oncogenic event in neuroblastoma, occurring either by mutation

(segregating in most neuroblastoma families or acquired de novo in about 10% of sporadic cases) or through alternative mechanisms such as MDK up-regulation.

According to the genetic model of neuroblastoma development, all neuroblastomas have a common precursor that could undergo transformation upon a common oncogenic event and further develop into one of two distinct types (leading to either good or poor-prognosis tumors)(1, 46). The detection of P-ALK in both favorable and unfavorable neuroblastomas and the observation of higher P-ALK levels in favorable cases (especially those diagnosed at a younger age) suggest that ALK activation is an early event initiating neuroblastoma, rather than a later event leading to progression of the disease. The remarkable clinical heterogeneity within neuroblastoma families(4, 46) and the detection of somatic ALK mutations across all subsets of patients(3-7, 9, 10) also support this model.

ALK targeting with the TAE684 compound showed cytotoxicity *in vitro* against all neuroblastoma cell lines, especially those expressing a mutated or a wild-type phosphorylated ALK. However, TAE684 retained antitumor activity *in vivo* only against the xenograft expressing the R1275Q ALK mutation. Similar results have been reported with the dual c-Met/ALK inhibitor crizotinib (PF-02341066)(47). These observations indicate that high-risk patients with a R1275Q mutated tumor could benefit from ALK targeting. This mutation is the most common in neuroblastoma(9) but is detected in only 4% of neuroblastoma cases, including low-risk patients(3, 4, 9) (who can experience spontaneous tumor regression or be cured with surgery alone).

In conclusion, ALK phosphorylation/activation is frequent and mainly independent of mutations in neuroblastoma. ALK is activated during neuroblastoma oncogenesis rather than during tumor progression and only very few patients at an advanced stage of the disease may have a target sensitive to current ALK inhibitors. Innovative approaches and designs will be needed to develop ALK inhibitors in neuroblastoma.

#### **Disclosure of Potential Conflicts of Interest**

No potential conflicts of interest were disclosed.

#### **Acknowledgements**

The authors thank Dr Philippe Viehl and Estelle Dubus-Daudigeos for technical assistance.

#### **Grant Support**

This work was supported by the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur; the Association pour la Recherche contre le Cancer; the Cancéropôle-Ile de France; the Association Hubert Gouin; the Fondation Charles Bruneau; and the Institut National du Cancer.

## REFERENCES

1. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature reviews* 2003;3: 203-16.
2. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *The New England journal of medicine* 2010;362: 2202-11.
3. Mosse YP, Laudenslager M, Longo L, *et al.* Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 2008;455: 930-5.
4. Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugieres L, *et al.* Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 2008;455: 967-70.
5. Chen Y, Takita J, Choi YL, *et al.* Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 2008;455: 971-4.
6. George RE, Sanda T, Hanna M, *et al.* Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 2008;455: 975-8.
7. Caren H, Abel F, Kogner P, Martinsson T. High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours. *The Biochemical journal* 2008;416: 153-9.
8. Martinsson T, Eriksson T, Abrahamsson J, *et al.* Appearance of the novel activating F1174S ALK mutation in neuroblastoma correlates with aggressive tumour progression and unresponsiveness to therapy. *Cancer research*.
9. De Brouwer S, De Preter K, Kumps C, *et al.* Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin Cancer Res* 2010;16: 4353-62.
10. Schulte JH, Bachmann HS, Brockmeyer B, *et al.* High ALK receptor tyrosine kinase expression supersedes ALK mutation as a determining factor of an unfavorable phenotype in primary neuroblastoma. *Clin Cancer Res*;17: 5082-92.
11. Webb TR, Slavish J, George RE, *et al.* Anaplastic lymphoma kinase: role in cancer pathogenesis and small-molecule inhibitor development for therapy. *Expert review of anticancer therapy* 2009;9: 331-56.
12. Kelleher FC, McDermott R. The emerging pathogenic and therapeutic importance of the anaplastic lymphoma kinase gene. *Eur J Cancer* 2010;46: 2357-68.



13. Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *The American journal of pathology* 2005;167: 213-22.
14. Armstrong F, Duplantier MM, Trempat P, *et al.* Differential effects of X-ALK fusion proteins on proliferation, transformation, and invasion properties of NIH3T3 cells. *Oncogene* 2004;23: 6071-82.
15. Miyake I, Hakomori Y, Shinohara A, *et al.* Activation of anaplastic lymphoma kinase is responsible for hyperphosphorylation of ShcC in neuroblastoma cell lines. *Oncogene* 2002;21: 5823-34.
16. McDermott U, Iafrate AJ, Gray NS, *et al.* Genomic alterations of anaplastic lymphoma kinase may sensitize tumors to anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *Cancer research* 2008;68: 3389-95.
17. Stoica GE, Kuo A, Aigner A, *et al.* Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *The Journal of biological chemistry* 2001;276: 16772-9.
18. Stoica GE, Kuo A, Powers C, *et al.* Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *The Journal of biological chemistry* 2002;277: 35990-8.
19. Naito A, Yoshikura H, Iwamoto A. Similarity of the genomic structure between the two members in a new family of heparin-binding factors. *Biochemical and biophysical research communications* 1992;183: 701-7.
20. Kadomatsu K, Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer letters* 2004;204: 127-43.
21. Nakagawara A, Milbrandt J, Muramatsu T, *et al.* Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas. *Cancer research* 1995;55: 1792-7.
22. Fiegel HC, Kaifi JT, Wachowiak R, *et al.* Midkine is highly expressed in neuroblastoma tissues. *Pediatric surgery international* 2008;24: 1355-9.
23. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, *et al.* Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 1993;11: 1466-77.
24. Thiele CJ. Neuroblastoma: In (Ed.) Masters, J. *Human Cell Culture*. Lancaster, UK: Kluwer Academic Publishers; 1998.
25. Ferrandis E, Da Silva J, Riou G, Benard I. Coactivation of the MDR1 and MYCN genes in human neuroblastoma cells during the metastatic process in the nude mouse. *Cancer research* 1994;54: 2256-61.
26. Vassal G, Terrier-Lacombe MJ, Bissery MC, *et al.* Therapeutic activity of CPT-11, a DNA-topoisomerase I inhibitor, against peripheral primitive neuroectodermal tumour and neuroblastoma xenografts. *British journal of cancer* 1996;74: 537-45.

27. Whiteford CC, Bilke S, Greer BT, *et al.* Credentialing preclinical pediatric xenograft models using gene expression and tissue microarray analysis. *Cancer research* 2007;67: 32-40.
28. Bettan-Renaud L, Bayle C, Teyssier JR, Benard J. Stability of phenotypic and genotypic traits during the establishment of a human neuroblastoma cell line, IGR-N-835. *International journal of cancer* 1989;44: 460-6.
29. Vacherot F, Delbe J, Heroult M, Barritault D, Fernig DG, Courty J. Glycosaminoglycans differentially bind HARP and modulate its biological activity. *The Journal of biological chemistry* 1999;274: 7741-7.
30. Mazot P, Cazes A, Boutterin MC, *et al.* The constitutive activity of the ALK mutated at positions F1174 or R1275 impairs receptor trafficking. *Oncogene*;30: 2017-25.
31. Yamamoto K, Ohta S, Ito E, *et al.* Marginal decrease in mortality and marked increase in incidence as a result of neuroblastoma screening at 6 months of age: cohort study in seven prefectures in Japan. *J Clin Oncol* 2002;20: 1209-14.
32. Woods WG, Gao RN, Shuster JJ, *et al.* Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *The New England journal of medicine* 2002;346: 1041-6.
33. Galkin AV, Melnick JS, Kim S, *et al.* Identification of NVP-TAE684, a potent, selective, and efficacious inhibitor of NPM-ALK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104: 270-5.
34. Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, *et al.* Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* 1997;14: 439-49.
35. Pulford K, Lamant L, Morris SW, *et al.* Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood* 1997;89: 1394-404.
36. Lamant L, Pulford K, Bischof D, *et al.* Expression of the ALK tyrosine kinase gene in neuroblastoma. *The American journal of pathology* 2000;156: 1711-21.
37. Dirks WG, Fahrnich S, Lis Y, Becker E, MacLeod RA, Drexler HG. Expression and functional analysis of the anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in tumor cell lines. *International journal of cancer* 2002;100: 49-56.
38. Passoni L, Longo L, Collini P, *et al.* Mutation-independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis neuroblastoma patients. *Cancer research* 2009;69: 7338-46.
39. Schonherr C, Ruuth K, Yamazaki Y, *et al.* Activating ALK mutations found in neuroblastoma are inhibited by Crizotinib and NVP-TAE684. *The Biochemical journal*;440: 405-13.

40. Kuo AH, Stoica GE, Riegel AT, Wellstein A. Recruitment of insulin receptor substrate-1 and activation of NF-kappaB essential for midkine growth signaling through anaplastic lymphoma kinase. *Oncogene* 2007;26: 859-69.
41. Reiff T, Huber L, Kramer M, Delattre O, Janoueix-Lerosey I, Rohrer H. Midkine and Alk signaling in sympathetic neuron proliferation and neuroblastoma predisposition. *Development (Cambridge, England)*;138: 4699-708.
42. Lu KV, Jong KA, Kim GY, *et al.* Differential induction of glioblastoma migration and growth by two forms of pleiotrophin. *The Journal of biological chemistry* 2005;280: 26953-64.
43. Moog-Lutz C, Degoutin J, Gouzi JY, *et al.* Activation and inhibition of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase by monoclonal antibodies and absence of agonist activity of pleiotrophin. *The Journal of biological chemistry* 2005;280: 26039-48.
44. Mathivet T, Mazot P, Vigny M. In contrast to agonist monoclonal antibodies, both C-terminal truncated form and full length form of Pleiotrophin failed to activate vertebrate ALK (anaplastic lymphoma kinase)? *Cellular signalling* 2007;19: 2434-43.
45. Perez-Pinera P, Zhang W, Chang Y, Vega JA, Deuel TF. Anaplastic lymphoma kinase is activated through the pleiotrophin/receptor protein-tyrosine phosphatase beta/zeta signaling pathway: an alternative mechanism of receptor tyrosine kinase activation. *The Journal of biological chemistry* 2007;282: 28683-90.
46. Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Delattre O. Molecular pathogenesis of peripheral neuroblastic tumors. *Oncogene* 2010;29: 1566-79.
47. Bresler SC, Wood AC, Haglund EA, *et al.* Differential inhibitor sensitivity of anaplastic lymphoma kinase variants found in neuroblastoma. *Science translational medicine*;3: 108ra14.

## **Présentation de l'article 2 : Midkine signals through ALK and other receptors to promote the survival of neuroblastoma cells**

La protéine ALK entière (sous forme sauvage ou mutée) et ses partenaires de signalisation apparaissent aujourd'hui comme des cibles thérapeutiques pour développer des stratégies thérapeutiques complémentaires aux inhibiteurs de tyrosine kinase, ciblant la protéine ALK activée. L'inhibition pharmacologique de phospho-ALK via les inhibiteurs spécifiques actuels a montré des résultats mitigés. Ils ne sont efficaces que dans des xénogreffes exprimant la mutation R1275Q ou une amplification de ALK, alors qu'aucun effet n'est obtenu dans des tumeurs sauvages pour ALK. Nous avons constaté dans notre étude précédente (article 1) que le ligand de ALK, MDK est fréquemment activé dans le neuroblastome et capable d'induire l'activation de ALK. Nous avons donc étudié le rôle de MDK dans la physiopathologie du neuroblastome et l'implication de ALK dans la transmission des signaux de MDK.

A l'aide de siRNAs dirigés contre MDK, nous avons inhibé l'expression de cette protéine dans des lignées cellulaires de neuroblastome et évalué l'effet de cette inhibition sur la viabilité cellulaire et sur le niveau d'expression et d'activation de ALK. L'influence de la sur-expression de MDK a également été évaluée *in vivo* sur la prise et la croissance d'une xénogreffe neuroblastique exprimant ALK sous forme sauvage. Nous avons également étudié la capacité de MDK à signaler par l'intermédiaire d'autres récepteurs que ALK.

Les résultats obtenus montrent que MDK régule la survie cellulaire du neuroblastome *in vitro* et sa prise tumorale *in vivo*. De façon intéressante, MDK est capable de réguler l'expression protéique et l'activation de ALK. De plus, la signalisation de MDK peut se produire par des voies dépendantes mais aussi indépendantes de ALK et passe notamment par les deux récepteurs suivants : low density lipoprotein receptor-related protein 1 et syndecan 3.

MDK apparaît donc comme une cible thérapeutique intéressante dans le neuroblastome. Dans cette tumeur, elle est très fréquemment exprimée, elle génère des signaux de survie cellulaire et régule l'expression et l'activation de ALK, un récepteur qui joue certainement un rôle clé dans le neuroblastome.

## **II. Article 2: Midkine signals through ALK and other receptors to promote the survival of neuroblastoma cells**

Fabienne Munier<sup>1,2,3</sup>, Marie Regairaz<sup>1,2,3</sup>, Jean Delbé<sup>4</sup>, Céline Renauleaud<sup>1,2,3</sup>, José Courty<sup>4</sup>, Lluís M. Mir<sup>1,2,3</sup>, Birgit Georger<sup>1,2,3</sup> and Gilles Vassal<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Institut Gustave Roussy, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, 94805 Villejuif, France

<sup>2</sup> Université Paris-Sud, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, 91405 Orsay, France

<sup>3</sup> Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), Orsay, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, 91405 Orsay, France

<sup>4</sup> Research on Cell Growth, Tissue Repair and Regeneration (CRRET) UMR CNRS 7149, Paris 12 University, Créteil, France

Running head: MDK signaling in neuroblastoma

## **ABSTRACT**

Midkine (MDK) is overexpressed in neuroblastoma but it is unclear whether MDK participates in neuroblastoma oncogenesis and MDK signaling pathways in neuroblastic cells are partially understood. One of its receptors is the Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK), reported as a key player in neuroblastoma oncogenesis. We explored whether MDK controls neuroblastoma cell proliferation and survival and further analyzed MDK transduction pathways. We found that MDK silencing *in vitro* significantly reduces neuroblastoma cell viability, in association with MDK expression but independently of ALK status or expression. MDK overexpression *in vivo* accelerates tumor engraftment in WT ALK neuroblastoma xenografts. In addition, MDK triggers the activation and protein expression of ALK in both WT and mutated ALK neuroblastoma cell lines. However, MDK is able to signal through receptors other than ALK, the low density lipoprotein receptor-related protein 1 and syndecan 3. In conclusion, MDK is a driving factor for multiple cell survival pathways in neuroblastoma cells, and therefore represents a relevant therapeutic target in neuroblastoma.

## **1. Introduction**

Neuroblastoma is a highly aggressive childhood tumor resulting from the malignant transformation of immature neural crest-derived cells. It is the most common malignancy diagnosed during the first year of life (Maris, 2010). The prognosis of this disease is extremely variable. Whereas a subset of tumors will undergo spontaneous regression, around half of all cases are classified as high-risk, with overall survival rates less than 40% (Maris et al., 2007; Perel et al., 2004). In spite of intensive multimodality treatments, neuroblastoma still accounts for around 15% of all deaths by cancer in children. Despite recent progress regarding molecular and genetic bases of this disease, the identification of additional neuroblastoma-specific molecular targets is still needed to develop more efficient therapeutic strategies.

The receptor tyrosine kinase (RTK) ALK is an attractive target, since it has been reported as a key player in neuroblastoma oncogenesis (Chen et al., 2008; George et al., 2008; Janoueix-Lerosey et al., 2008; Mosse et al., 2008). Oncogenic ALK-activating mutations have been found in most familial neuroblastoma cases and in 7% of sporadic cases (De Brouwer et al., 2011). Two mutation hotspots were reported at F1174L and R1275Q (Chen et al., 2008;

George et al., 2008; Janoueix-Lerosey et al., 2008; Mosse et al., 2008) In addition, ALK amplifications were reported in approximately 3% of cases (Mosse et al., 2008). Clinical investigations of the dual ALK/c-Met inhibitor, crizotinib are currently ongoing in children with anaplastic large cell lymphoma or relapsed or refractory solid tumors including neuroblastoma (NCT00939770).

Moreover, ALK activation has been detected in 50% of neuroblastoma cases, a fraction largely higher than that presenting ALK mutations (Regairaz et al., unpublished data). This underlines the existence of mutation-independent mechanisms leading to ALK activation in a majority of neuroblastoma cases (Passoni et al., 2009) (Regairaz et al., unpublished data) and suggests that both WT and mutated ALK could represent relevant therapeutic targets in this disease. ALK has the classical structure of a RTK and its activation typically requires ligand-induced receptor oligomerization, which results in tyrosine autophosphorylation of the receptor. Mechanisms leading to ALK activation are not fully elucidated, but the two homologous proteins, pleiotrophin (PTN) and MDK have been reported as potential ALK ligands (Stoica et al., 2001; Stoica et al., 2002). While PTN ability to activate ALK has been controversial (Moog-Lutz et al., 2005), MDK has been shown to directly trigger ALK signaling in different types of cell lines (Kuo et al., 2007; Reiff et al., 2011; Stoica et al., 2002). MDK is a cytokine with widespread functions in proliferation, survival, angiogenesis and cell migration (Papadimitriou et al., 2004). MDK can elicit these various biological processes through binding to several receptors, including ALK, syndecan 3 (SDC3), receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta (RPTP  $\beta/\zeta$ ), and low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) (Maeda et al., 1999; Muramatsu et al., 2000; Nakanishi et al., 1997; Stoica et al., 2002). MDK-mediated downstream signaling recruits insulin receptor substrate-1 or Src kinase and activates a variety of intracellular transducers such as PI3K/AKT, ERK/MAPK and STAT3, (Kadomatsu and Muramatsu, 2004; Muramatsu, 2010). MDK expression is very low in normal tissues but is detected in a variety of tumors, including gastric carcinoma, urinary bladder carcinoma, prostate carcinoma, uterine carcinoma, pancreatic carcinoma, astrocytoma and neuroblastoma (Kaifi et al., 2007; Konishi et al., 1999; Maeda et al., 2007; Mishima et al., 1997; Nakagawara et al., 1995; O'Brien et al., 1996; Tanabe et al., 2008). Interestingly, high intratumoral MDK expression was associated with a worse prognosis in these tumors. In addition, high MDK levels in serum correlate with poor prognosis in neuroblastoma (Ikematsu et al., 2003) suggesting that MDK is involved in neuroblastoma pathogenesis. We thus postulated that in addition to mutated ALK, MDK and

its signaling partners, remarkably WT ALK could represent tractable targets in neuroblastoma. In this study, we investigated the involvement of MDK in the promotion of neuroblastoma cell proliferation and survival by signaling through ALK and other MDK receptors.

## 2. Materials and methods

### Cell lines and siRNA transfection

The five human neuroblastoma cell lines, IMR-32, LAN-1, IGR-NB8, IGR-N91 and SH-SY5Y derive from patients with advanced stages of disease. All cells were grown in T75 flasks under standard cell culturing conditions. siRNA against MDK, ALK and the non-targeting siRNA were designed using the website : <http://www.biopredsi.org/start.html>. The forward and reverse sequence were respectively: 5'-GCCAAGGCACCCUGAAGAAGG-3' and 5'-UUCUUCAGGGUGCCUUGGCGG-3', for MDK 5'-CCUACGUUUUAAGAUGAAGG-3' and 5'-UUCAUCUAAAACGUAGGTG-3', for ALK, 5'-AGACGGUGGUCAUUACCUAGT-3' and 5'-UAGGUA AUGACCACCGUCUTT-3', for the control. These siRNAs were synthesised by Sigma-Aldrich and used according to manufacturer's instructions. The anti-LRP1 and anti-SDC3 siRNAs were commercial siRNAs (Santa Cruz) and used according to manufacturer's instructions. Each siRNA was transfected into cells seeded in 6-well plates for Western Blot and RT-PCR analyses or in 96-well plates for viability assays. Each oligonucleotide was transfected using Oligofectamine (Invitrogen). 72 hours after transfection, cells were harvested for Western Blot and RNA extraction or submitted to cell viability assay.

### Measurement of cell viability

Assays were done using the CellTiter96 Aqueous Nonradioactive Assay kit (Promega) per manufacturer's instructions. Cells were seeded in 96-well plates to reach 50% confluency at the time of transfection. The growth rate was analyzed following 72 hours after transfection. Absorbance was measured at a wavelength of 490nm and the absorbance values were transformed as percentage of viability using cells transfected with the non-targeting siRNA.



### ***In vivo DNA electrotransfer***

All *in vivo* experiments were carried out under the conditions established by the European Union (directive 86/609/CEE). Before the electrotransfer procedure, 6-8 week-old female Swiss athymic mice were anesthetized with an i.p. injection of 100 mg/kg ketamine (Ketalar, Panpharma) and 40 mg/kg xylazine (Rompun, Bayer). The two plasmidic constructions pcDNA3-MDK or pcDNA3-LacZ were kindly provided by Dr José Courty, Créteil, France. Plasmidic DNA was purified using endoFree Plasmid Maxi kit (Qiagen) and solubilized in endotoxin-free 0.9% NaCl at working concentrations. Twenty µg of DNA were injected into both tibialis cranialis muscles of mice. The DNA was then electrotransferred using two successive electric pulses (800 V/cm during 100 µsec then 80 V/cm during 400 msec) (Satkauskas et al., 2002) delivered by a Cliniporator generator (IGEA). The contact of the electrodes with the skin was assured by application of a gel (EKO-GEL, Egna). Three days after DNA electrotransfer, fragments of neuroblastoma IGR-NB8 R xenografts (15-30 mm<sup>3</sup>) were implanted subcutaneously to the mice. IGR-NB8-R xenograft, previously established at Gustave-Roussy Institute (Calvet et al., 2004) expresses high level of WT ALK. Tumor take rates and volumes were evaluated twice weekly. The tumor volume was calculated according to the following equation:  $V \text{ (mm}^3\text{)} = (d^2 \text{ (mm}^2\text{)} * D \text{ (mm)}) / 2$ , where d and D are the smallest and largest perpendicular tumor diameters, respectively. Mice were sacrificed when their tumor reached a volume of 1500–2000mm<sup>3</sup> or after three months if no tumor has grown. Tumor and muscle were resected and frozen.

### **Western Immunoblotting**

Cell pellets or frozen tumors were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% NP-40, supplemented with proteases and phosphatases inhibitors) before clearing by centrifugation. The detection of MDK in muscle was preceded by an heparin-sepharose precipitation (Amersham Biosciences), described previously (Vacherot et al., 1999). Proteins (50 µg) were separated by SDS-PAGE electrophoresis, transferred to PVDF membranes and immunoblotted with the following primary antibodies: anti-MDK (R&D Systems), anti-ALK (Invitrogen), anti-P-ALK, anti-STAT3, anti-P-STAT3, anti-AKT, anti-P-AKT, anti-MAPK, anti-P-MAPK (Cell Signaling Technology) and anti-β-actin (Sigma-Aldrich). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (anti-mouse or -rabbit) were detected by enhanced chemiluminescence (Pierce).

### **Reverse transcription-PCR**

Total RNA was isolated from cultured cells using the RNeasy kit (Qiagen). Total RNA (1 µg) was reverse transcribed using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) and random primers (Invitrogen). 1/10 of the product were used as templates for multiplex PCR containing the duplex (forward and reverse) of the commercial fluorescent primers coding for MDK, ALK, RPTP β/ζ, LRP1, SDC3 or 18s (Applied Biosystems), the later one being used for normalization. The PCR reaction mixture contained 2X PCR Universal Master Mix (Applied Biosystems), 20X of each primers and 10 ng of each cDNA. The expression of each mRNA was analyzed using the 7900HT FastReal-Time PCR system (Applied Biosystems). The PCR reaction consists of 2min at 50°C, 10min at 95°C followed by 45 cycles alternating 15s at 95°C and 1 min at 60°C. The levels of gene expression were normalized using 18s housekeeping gene levels based on comparative threshold cycle method.

### **SDC3, LRP1 and RPTPβ/ζ expression profiling analyses**

Expression profiling analyses were performed using the publicly available Pediatric Tumor Affymetrix Database (Whiteford et al., 2007) (<http://pob.abcc.ncifcrf.gov/cgi-bin/JK>). The database was searched by querying SDC3, LRP1 and PTPRZ1 (gene symbol for RPTPβ/ζ). Bar-charts represent output median-centered log2 ratios.

### **Statistical analysis**

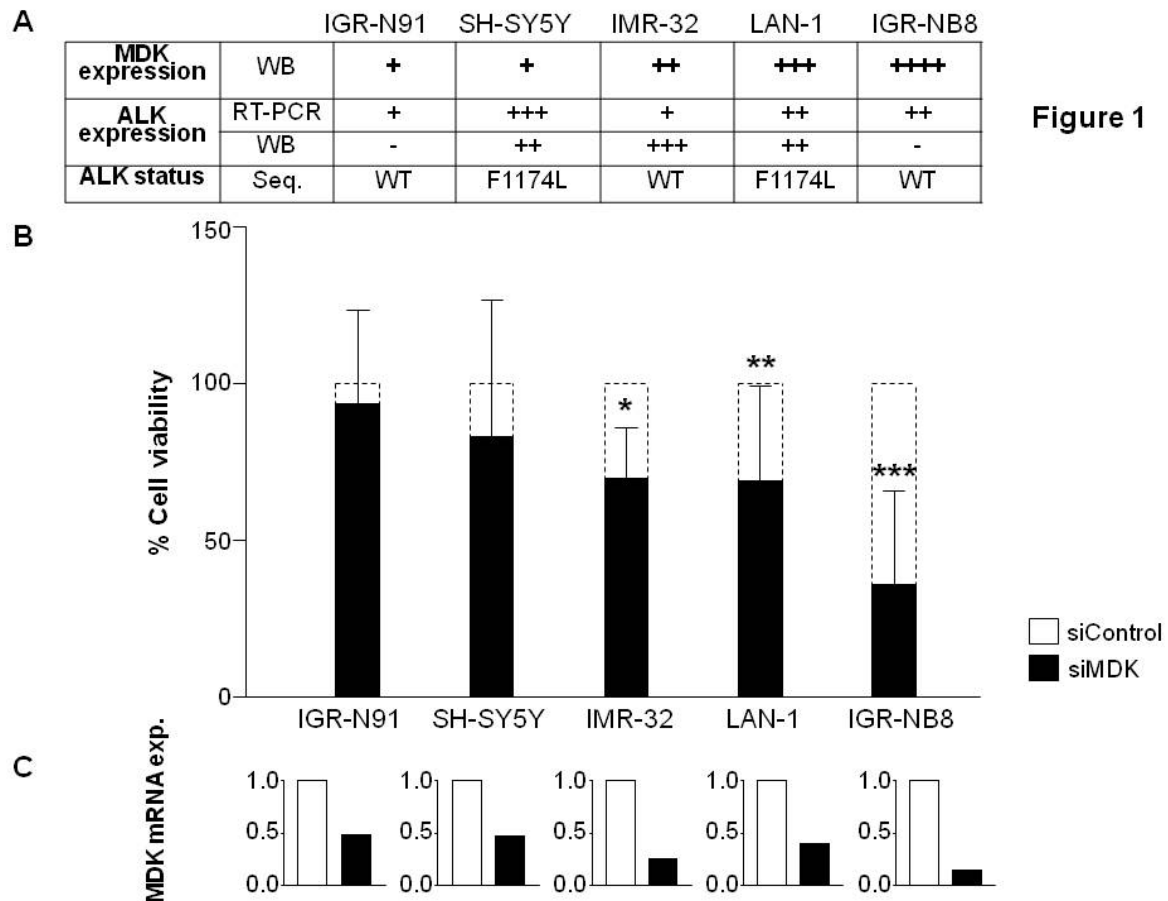
Cell culture based assays and *in vivo* experiments were repeated three times, allowing calculation of SEM. Western Blots were reproduced at least two times. Statistical significances were assessed using the Mann-Whitney test regarding *in vitro* viability assays and using the Student's *t* test for *in vivo* experiments. The statistical analyses were carried out using the Software Graph Pad Prism version 3.0. P values were considered statistically significant when less than 0.05 (\*, P<0.05 ; \*\*, P<0.01 ; \*\*\*, P<0.001).

## **3. Results**

### **MDK contributes to neuroblastoma cell survival *in vitro***

To determine whether MDK is involved in neuroblastoma cell survival, endogenous MDK expression was inhibited by siRNA in a panel of five neuroblastoma cell lines. As shown in figure 1A, the selected cells express different levels of MDK and ALK, and show various

ALK status (either WT or mutated). Cells were transfected with a MDK-targeting siRNA and cell viability was measured 72 hours after transfection. MDK silencing was associated with a significant reduction of cell viability (between 30% and 65%) in three out of the five cell lines tested (Fig. 1B). These three cell lines (IMR-32, LAN-1 and IGR-NB8) were those expressing high MDK levels (Fig.1A). Furthermore, the cytotoxicity of MDK knock-down was correlated with basal MDK expression level. Nevertheless MDK silencing exhibited cytotoxic activity in cells expressing either low (IGR-NB8) or high (IMR-32) ALK levels and in both WT (IMR-32 and IGR-NB8) and ALK mutated (LAN-1) cell lines (Fig. 1A). Altogether these results demonstrate that MDK directly regulates cell survival pathways in neuroblastoma cells, independently of ALK status or expression.



**Figure 1**

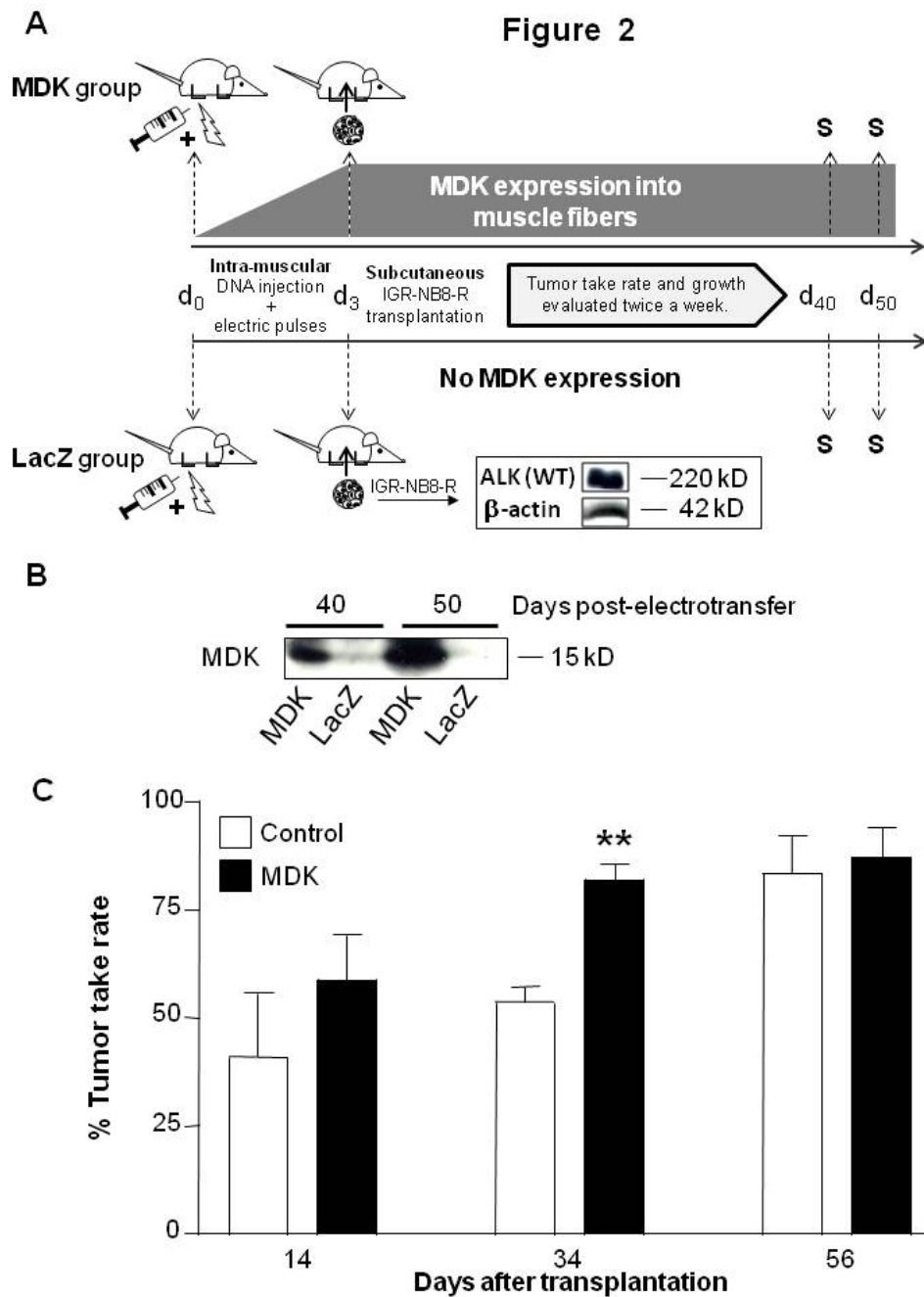
**Figure 1 – Down-regulation of MDK by siRNA reduces neuroblastoma cell viability.**

(A) Recapitulative of MDK expression level and ALK expression level and status. Expression intensity was scored as follows: - not detectable, + to ++++: barely detectable to very high expression. MDK and ALK proteic expressions were detected by Western Blot. ALK mRNA expression was evaluated using Q-RT-PCR. ALK status was determined after sequencing of the tyrosine kinase domain of ALK, previously amplified by PCR. (B) Quantitative analysis of cell viability evaluated by a MTS assay in five cell lines transfected with a MDK-targeting siRNA (black bars) and reported to viability after transfection with a non-targeting siRNA (dotted white bars). Bars represent means of three independent experiments. Error bars are SEM, \*,  $P < 0.05$  ; \*\*,  $P < 0.01$  and \*\*\*,  $P < 0.001$  were calculated using the Mann Whitney test (C) Silencing of the mRNA coding for MDK was confirmed by Q-RT-PCR. 18s housekeeping gene was used as reference gene.

**MDK promotes neuroblastoma tumorigenicity *in vivo***

We then evaluated if MDK could control growth and development of neuroblastoma *in vivo*. The production of MDK was achieved using DNA electrotransfer (Andre et al., 2008; Satkauskas et al., 2002). Briefly, LacZ- (control) or MDK-encoding DNAs were injected in the skeletal muscles of nude mice, to which electric pulses were then applied (Fig.2A). MDK was thus produced in the muscle fibers and further delivered into the systemic circulation. Three days after the electrotransfer, IGR-NB8-R neuroblastoma xenografts were transplanted

subcutaneously to mice. IGR-NB8-R xenografts were previously established *in vivo* (Calvet et al., 2004) and express a high level of WT ALK (Fig 2A). Western Blot analyses were performed to detect MDK expression in the muscle. Tumor development was then evaluated by following the tumor take rates (TTR) and tumor growth. As shown in the figure 2B, it was possible to detect MDK expression in muscles more than one month (i.e 40 and 50 days) after the electrotransfer. Moreover, tumors engraftment was improved by electrotransfer of the MDK-encoding DNA. Indeed, 34 days after transplantation the TTR was significantly higher in the group overexpressing MDK (82%) compared to the TTR in the LacZ group (53%), (Fig. 2C). In contrast, MDK overexpression had no effect on tumor growth since doubling times were not different between control and MDK groups (supplemental figure 3, annexes). In summary, these data indicate that MDK is able to promote neuroblastoma tumorigenicity *in vivo*.

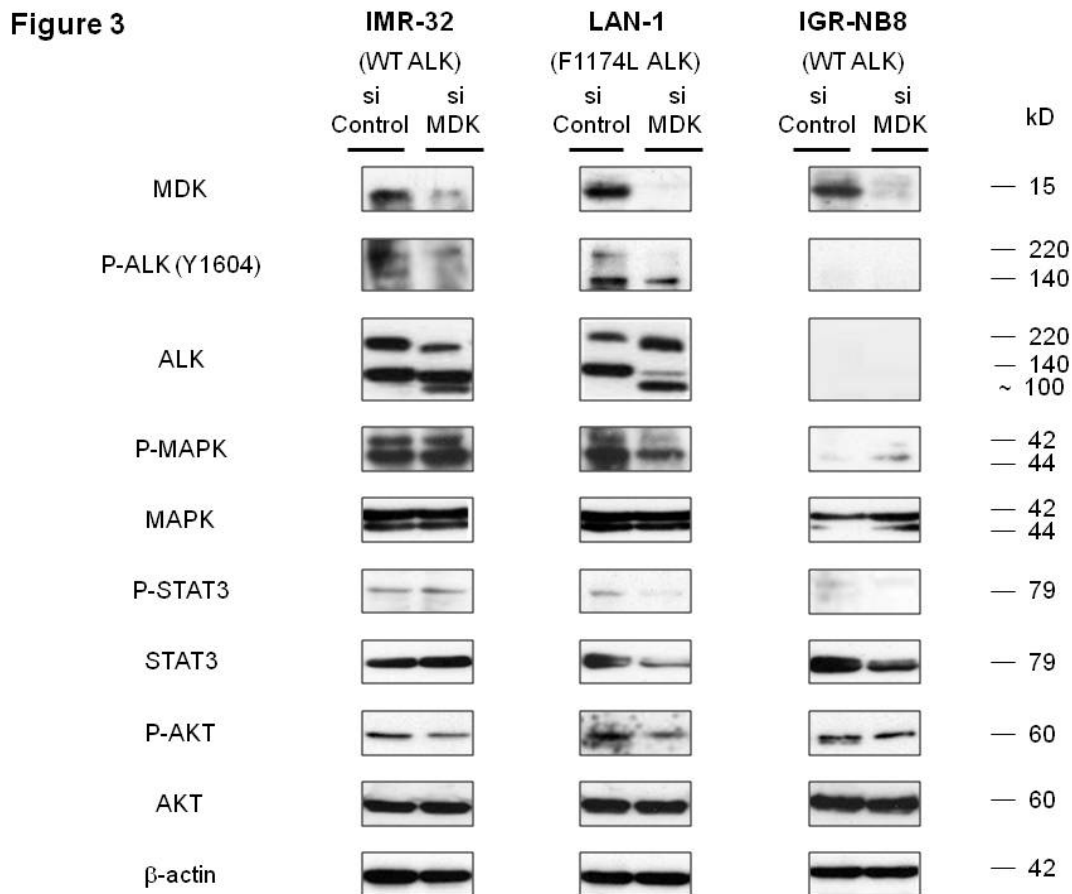


**Figure 2 – *In vivo* MDK-encoding DNAs electrotransfer enhances the tumorigenicity of neuroblastoma xenograft (IGR-NB8-R, expressing a WT ALK).**

Schematic representation of electrotransfer experimental procedure. At day 0, injection of DNA coding for MDK or LacZ were performed and followed by electric pluses application in both tibialis cranialis muscles. At day 3, IGR-NB8-R neuroblastoma tumors fragments were transplanted IGR-NB8-R was previously established *in vivo* (Calvet et al., 2004) and expresses WT ALK. ALK expression was evaluated using western blot analysis and  $\beta$ -actin was used as a loading control. S means sampling times when MDK detection in the muscle was realized (see fig. 2B). XG means xenograft. **(B)** MDK expression evaluated by Western Blot analysis in the muscle of mice, 40 and 50 days post-electrotransfer **(C)** Effect of MDK overexpression on the TTR of neuroblastoma xenografts. Bars represent means of three independent experiments including at least 5 mice/group. Error bars are SEM, \*\*  $P < 0.01$  was calculated using the Student's *t* test.

### **MDK silencing reduces ALK activation and proteic expression**

To further determine whether MDK could regulate ALK, we followed ALK expression and activation upon MDK knockdown. In IMR-32 (WT ALK) and LAN-1 (F1174L ALK), ALK phosphorylation was markedly reduced following MDK silencing (Fig.3). In addition, in the two aforementioned cells, MDK silencing was associated with a decrease of total ALK protein expression levels. ALK is expressed as a 220 kD full length, mature form and a shorter species of 140 kD that results from an extracellular cleavage of the 220 kD form (Moog-Lutz et al., 2005). The basal pattern of ALK expression is different between both cell lines. In the WT-ALK, IMR-32 cells, the 220 kD full size form was significantly decreased upon MDK silencing while the 140kD cleaved form was more affected in the mutated cell lines, LAN-1 (Fig.3). In both ALK WT and mutated cells MDK knockdown resulted in the appearance of a third band at approximately 100 kD (Fig.3) that potentially represents a cleavage product of the receptor. In addition we monitored the effect of MDK knockdown on ALK downstream signaling, namely STAT3, AKT and MAPK, known to drive ALK-mediated anti-apoptotic signals. In the mutated (F1174L) ALK cells, LAN-1 the phosphorylation inhibition was pronounced for all the downstream effectors observed (Fig.3). In IMR-32 and IGR-NB8, a slight phosphorylation decrease was visible for AKT and STAT3 respectively (Fig.3). Altogether, those results present MDK as a direct regulator of ALK expression and activation.



**Figure 3 – Inhibition of ALK activation and expression occurs upon MDK silencing in neuroblastoma cell lines.**

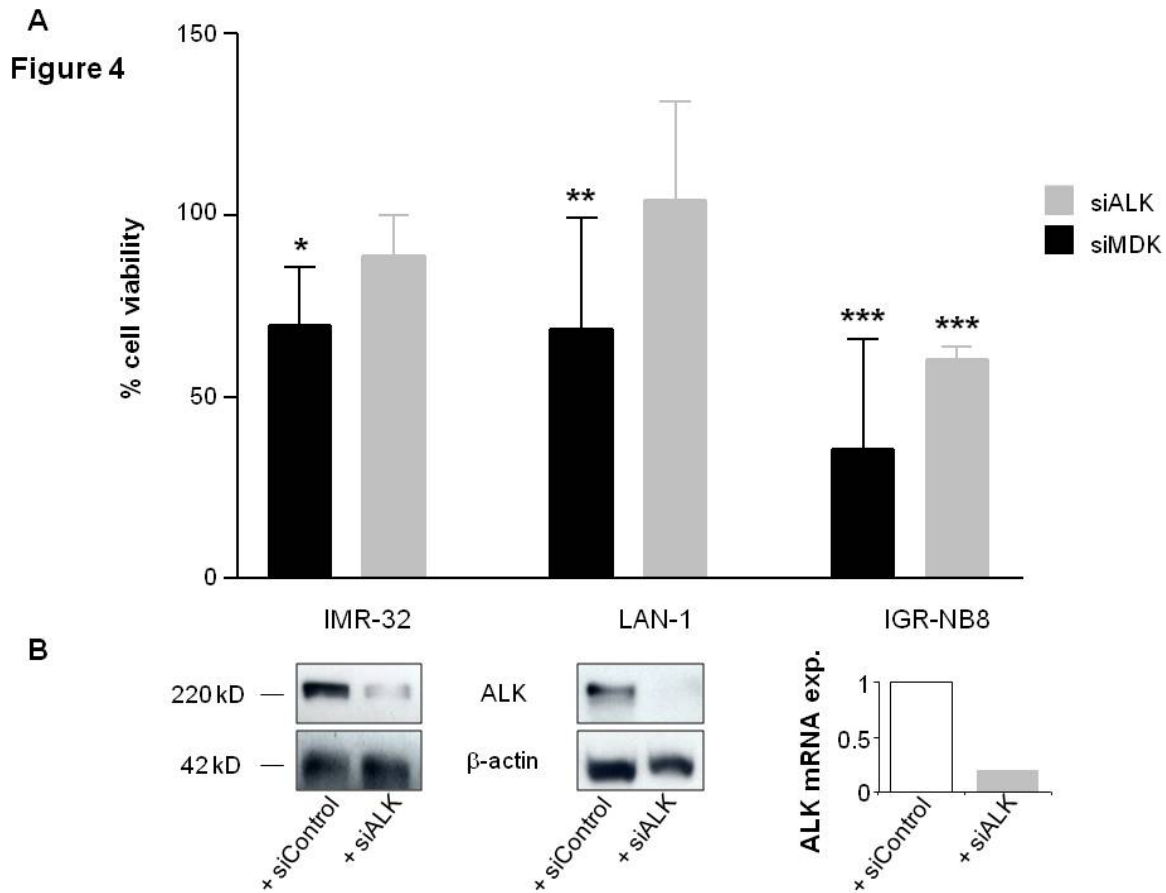
Detection of ALK, phospho-ALK and ALK downstream signaling after MDK silencing using Western Blot. β-actin was used as a loading control.

### MDK signaling requires several receptors

We then speculated that ALK could represent a receptor for MDK survival signaling. We therefore evaluated if the effects induced by MDK silencing could be recapitulated by a direct targeting of ALK. The three cell lines that presented sensitivity against the MDK-targeting siRNA were chosen for this experiment. Neuroblastoma cells were transfected with an ALK-targeting siRNA and cell viability was measured 72 hours after transfection. The inhibition of ALK protein level was followed using Western Blot in IMR-32 and LAN-1 (Fig. 4B). The abrogation of ALK mRNA was evaluated by RT-PCR in IGR-NB8 (Fig. 4B). Whereas, in IGR-NB8 cells ALK knockdown was accompanied by an important rate of mortality (approximately 40%), cell viability was not notably modified in IMR-32 and LAN-1 (less than 18% of mortality) (Fig.4A). These data demonstrated that ALK knockdown does not



always recapitulate the effects of MDK silencing and that MDK might thus stimulate cell growth via both ALK-dependent and ALK-independent pathways.



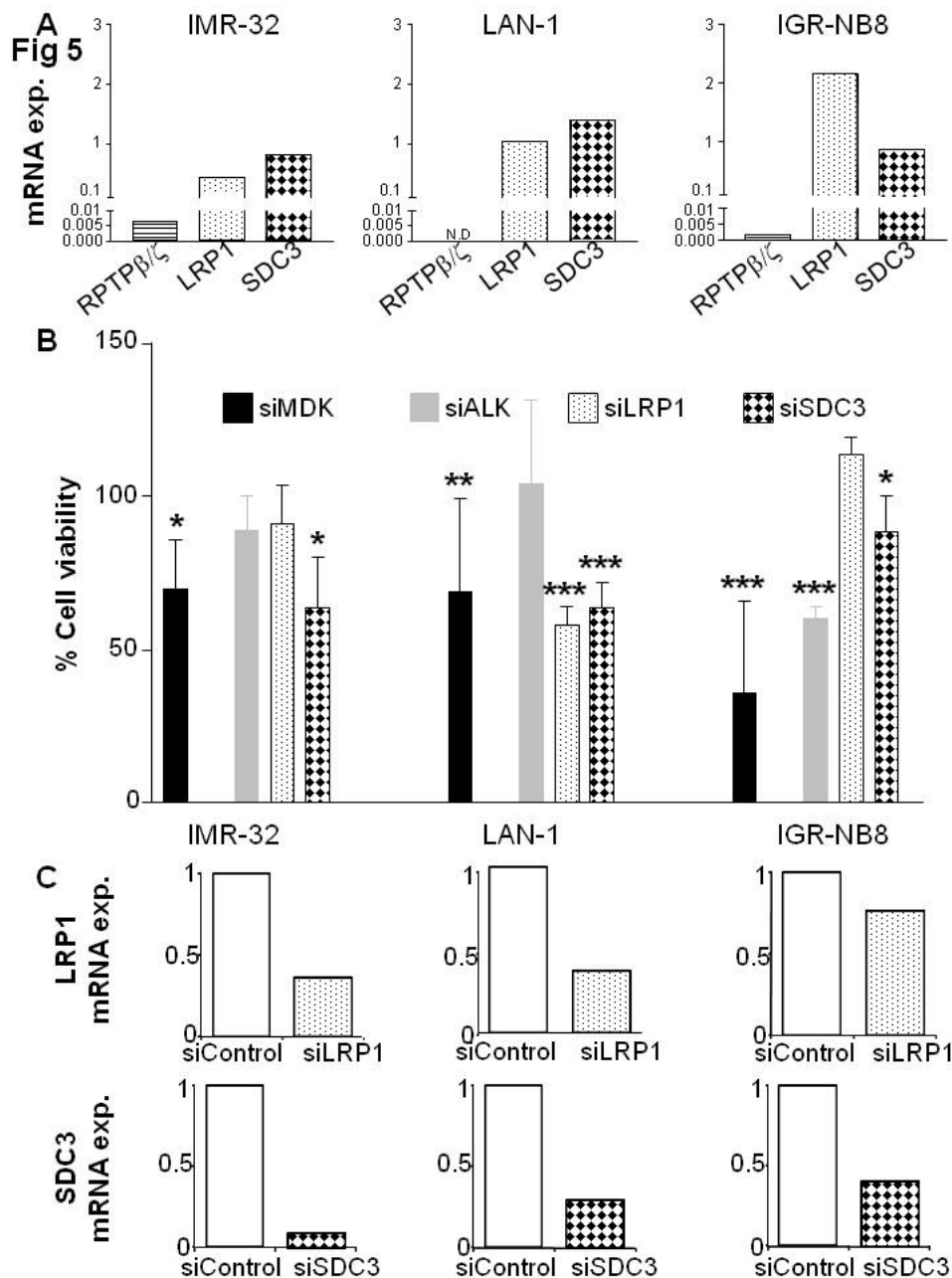
#### Figure 4 –ALK mRNA expression and silencing in neuroblastoma cell lines

Quantitative analysis of cell viability evaluated by a MTS assay in three cell lines transfected with a ALK-targeting siRNA (grey bars). Viability was reported to viability after transfection with a non-targeting siRNA (data not shown). Black bars represent the previously presented results of cell viability after MDK silencing (Fig.1A). Bars are means of three independent experiments. Error bars indicate SEM, \*  $P < 0.05$  and \*\*\*  $P < 0.001$  were calculated using the Mann Whitney test. **(B)** Abrogation of the protein ALK was followed by Western Blot in IMR-32 and LAN-1 cells,  $\beta$ -actin was used as a loading control. Silencing of the mRNA coding for ALK was confirmed by Q-RT-PCR in IGR-NB8 cells, using the 18s housekeeping gene as reference gene.

#### LRP1 and SDC3 are involved in the transduction of MDK signaling

Finally, we wondered whether the other receptors of MDK could drive MDK signaling in neuroblastoma cells. In addition to ALK, the expression of three MDK receptors (RPTP $\beta$ / $\zeta$ ,

LRP1 and SDC3) was evaluated using Q-RT-PCR experiment in three cell lines (Fig. 5A). While LRP1 and SDC3 were expressed in all three cell lines, RPTP $\beta/\zeta$  was detected at a low level in IMR-32 and IGR-NB8 but was not detectable in LAN-1 (Fig. 5B). This is consistent with publicly available database showing that additionally to ALK and MDK, LRP1 and SDC3 are detected in neuroblastoma whereas RPTP $\beta/\zeta$  expression is extremely low in those tumors (Supplemental figure 4, annexes). According to those results, LRP1 and SDC3 were targeted using siRNA *in vitro*. Cell viability obtained 72 hours after the inhibition of each receptor was compared to the effect of a non-targeting siRNA and confronted to the viability observed after MDK or ALK silencing. Remarkably, SDC3 silencing was correlated with an important reduction of cell viability in all cell lines, particularly for LAN-1 and IMR-32, which experienced approximately 40 % of viability decrease (Fig. 5B). In addition, for LAN-1, LRP1 silencing was also associated with an important reduction of cell viability (more than 40%) (Fig. 5B). Altogether, down regulation of at least one out of the three MDK receptors: ALK, LRP1 or SDC3 recapitulates the effect induced by MDK knock-down. These data reveal the complexity of MDK signaling network, involving at least three receptors (SDC3, ALK and LRP1) to promote neuroblastoma survival.



**Figure 5 –MDK receptors mRNA expression and silencing in neuroblastoma cell lines**

(A) Quantitative evaluation of the mRNA expression of RPTPβ/ζ, LRP1 and SDC3 by Q-RT-PCR in three neuroblastoma cell lines. 18s housekeeping gene was used as reference gene. Pooled mRNA expressions of each receptor in these 3 neuroblastoma cell lines (IMR-32, IGR-NB8, LAN-1) were used as control sample to calculate the relative mRNA expression. N.D means not detected. (B) Quantitative analysis of cell viability evaluated by a MTS assay in cell lines transfected with a LRP1-targeting siRNA (point bars) or a SDC3-targeting siRNA (checked bars) reported to viability after transfection with a non-targeting siRNA (data not shown). Black and grey bars represent the previously presented results of cell viability after MDK and ALK silencing, respectively (Fig.1A and 4A). Bars are means of three independent experiments. Error bars are SEM, \* P<0.05 and \*\*\* P< 0.001 were calculated using the Mann Whitney test. (C) Silencing of the mRNA coding for LRP1 and SDC3 was confirmed by Q-RT-PCR. 18s housekeeping gene was used as reference gene.

## 4. Discussion

MDK has been linked to poor prognosis in numerous tumors, including neuroblastoma (Muramatsu, 2010 ; Nakagawara et al., 1995). More generally, MDK appears as an interesting target in cancer, particularly in colon carcinoma, prostate carcinoma, osteosarcoma, soft tissue sarcoma, uterine carcinoma, hepatocellular carcinoma since its inhibition through antisense oligo (DNA) or antibodies lead to a reduction of cell proliferation *in vitro* or tumor growth *in vivo* (Dai et al., 2009; Jin et al., 2008; Maehara et al., 2007; Takei et al., 2001; Tanabe et al., 2008). MDK signal transduction pathways are only partially understood, notably in neuroblastoma. We demonstrate that MDK activates specific pathways resulting in neuroblastoma cell proliferation *in vitro* and enhanced tumor engraftment *in vivo* supporting that MDK contributes directly to cell viability and tumor development. More precisely, the basal level of MDK expression seems crucial to control these effects and suggests that neuroblastoma cells should develop a dependency on MDK signaling that is required for survival. MDK overexpression by cells might confer an advantage of growth and aggressivity.

An attractive hypothesis was to consider that MDK signals mainly through the receptor ALK. This receptor was reported as a key player in neuroblastoma through genetic alterations (Chen et al., 2008; George et al., 2008; Janoueix-Lerosey et al., 2008; Mosse et al., 2008). More recently mutation independent mechanisms have been suggested involved in ALK activation in neuroblastoma (Passoni et al., 2009; Schulte et al., 2011). In diverse cell types MDK has been proven to activate ALK (Kuo et al., 2007; Reiff et al., 2011 ; Stoica et al., 2002).

Our study conducted in neuroblastoma cells prove that MDK directly drives ALK activation which is linked to the whole receptor stabilization. Interestingly, MDK is able to activate ALK not only in WT ALK cells but also in F1174L mutated ALK cells. Similarly, increase of ALK phosphorylation has been already achieved in cells expressing both mutated forms of ALK (F1174L as well as R1275Q) following treatment with ALK agonists (Mazot et al., 2011). Thus, mutations do not render ALK independent from the ligand-controlled regulation. To the best of our knowledge, it has never been demonstrated that ALK mutations changed the conformation of ALK ligand binding domain, suggesting that ALK ligands could still bind mutated receptors. It is also worthy to note that the reported ALK mutations are heterozygous (Janoueix-Lerosey et al., 2010), the WT allele being preferentially expressed in a majority of cases (Schulte et al., 2011). Similarly in our study, the two mutated cells (SH-SY5Y and LAN-1) expressed the mutation at heterozygous status (data not shown). Therefore, in

mutated ALK cells, MDK may stimulate both forms of the receptor, increasing its basal phosphorylation.

In this study, we prove that MDK activates ALK and results in pro-survival effects in some neuroblastoma cells. However in other neuroblastoma cells, those effects can not be observed, implying that non-ALK mediated MDK signaling exists and is involved in neuroblastoma viability. Remarkably, MDK involvement was reported in tumors not necessarily expressing ALK, reinforcing a role of MDK independently of ALK. MDK signaling network is complex (Kadomatsu and Muramatsu, 2004), several MDK-binding cell-surface proteins other than ALK have been identified, including syndecans, RPTP $\beta/\zeta$  and the LRP1 (Maeda et al., 1999; Muramatsu et al., 2000; Nakanishi et al., 1997). According to their reported expression in neuroblastoma, LRP1 and SDC3 were down-regulated. Remarkably, in each cell line SDC3 knock-down is cytotoxic, demonstrating the importance of this receptor in neuroblastoma survival. In addition LRP1 silencing is associated with a reduction of viability in one cell line. Thus MDK signaling, driving cell viability can be transmitted through at least three receptors, SDC3, ALK and LRP1. Our data reveal that MDK is a central driving signal, a hub of complex pro survival signals in neuroblastoma, representing therefore an attractive target in this disease.

Although not demonstrated in neuroblastoma cells, the signaling of those receptors upon MDK stimulation has already been shown to drive the growth, migration and survival of several cell types, including embryonic neurons, Wilms tumor cells, rectal and adrenal carcinoma cells (Chen et al., 2007; Sakaguchi et al., 2003; Stoica et al., 2002). Thus MDK appears as a widespread and central target, which downstream signaling could be enhanced by different receptors, acting together as a multifunctional receptor complex (Kadomatsu and Muramatsu, 2004). In neuroblastoma as in other MDK-expressing tumors, evaluating which receptors are expressed and drive MDK signaling should be highly informative. In the context of a personalized medicine approach, MDK and its receptors could represent biomarkers allowing the discrimination of tumor subtypes and the elaboration of targeted therapies. According to a pediatric tumors database, presented in supplemental figure 4 (annexes), in addition to neuroblastomas, sarcomas, brain tumors and Wilms tumors, also expressing MDK and some of its receptors should benefit from such a screening. On another hand, cytokine targeting represents an attractive therapeutic approach in cancer and particularly in neuroblastic tumors, which growth involves numerous extracellular signals and growth factors. Particularly, VEGF and Il-6 are associated with neuroblastoma angiogenesis and cell

growth, respectively and their expressions correlate with poor prognosis cases (Pistoia et al., 2011). Interestingly, molecules targeting VEGF (bevacizumab and aflibercept) are subject of clinical investigations for children with refractory solid tumors, including neuroblastoma (NCT00085111 , NCT00622414). Moreover, anti-interleukin 6 monoclonal antibody (sirukumab) might soon be tested in patients after a successful preclinical evaluation in neuroblastoma models (Xu et al., 2011).

Our study gives a rational to consider MDK signaling partners as relevant biomarkers and therapeutic targets for children with cancer and particularly neuroblastoma and reinforces a real interest to develop MDK inhibitors.

### **Acknowledgments**

We thank the staff of the Service Commun d'Expérimentation Animale of the Gustave Roussy Institute for animal maintenance. This research has been supported by the Cancéropôle-Ile de France (FM), the Ligue Nationale contre le Cancer (FM), the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (MR), the Association pour la Recherche contre le Cancer (MR) and an Inca-DHOS grant (GV).

### **Abbreviations list**

ALK, Anaplastic Lymphoma Kinase ; ERK, Extracellular signal regulated kinases ; LRP1, low density lipoprotein receptor-related protein 1 ; MAPK, mitogen-activated protein kinase ; MDK, midkine ; mRNA, messenger RNA ; PI3K, Phosphatidylinositol 3-kinase ; PTN, pleiotrophin ; Q-RT-PCR, quantitative RT-PCR ; RTK, receptor tyrosine kinase ;RPTP $\beta/\zeta$ , receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta ;S, sampling ;SDC3, syndecan3 ; siRNA, small interfering RNA ; STAT3, Signal transducer and activator of transcription3 ; TTR, Tumor take rate ; WB, Western Blot ; XG, xenografts

### **References**

Andre, F.M., J. Gehl, G. Sersa, V. Preat, P. Hojman, J. Eriksen, M. Golzio, M. Cemazar, N. Pavselj, M.P. Rols, D. Miklavcic, E. Neumann, J. Teissie, and L.M. Mir. 2008. Efficiency of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor, and skin. *Hum Gene Ther.* 19:1261-71.

Calvet, L., A. Santos, A. Valent, M.J. Terrier-Lacombe, P. Opolon, J.L. Merlin, G. Aubert, J. Morizet, J.H. Schellens, J. Benard, and G. Vassal. 2004. No topoisomerase I alteration in a neuroblastoma model with in vivo acquired resistance to irinotecan. *Br J Cancer.* 91:1205-12.

- Chen, S., G. Bu, Y. Takei, K. Sakamoto, S. Ikematsu, T. Muramatsu, and K. Kadomatsu. 2007. Midkine and LDL-receptor-related protein 1 contribute to the anchorage-independent cell growth of cancer cells. *J Cell Sci.* 120:4009-15.
- Chen, Y., J. Takita, Y.L. Choi, M. Kato, M. Ohira, M. Sanada, L. Wang, M. Soda, A. Kikuchi, T. Igarashi, A. Nakagawara, Y. Hayashi, H. Mano, and S. Ogawa. 2008. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature.* 455:971-4.
- Dai, L.C., X. Yao, X. Wang, S.Q. Niu, L.F. Zhou, F.F. Fu, S.X. Yang, and J.L. Ping. 2009. In vitro and in vivo suppression of hepatocellular carcinoma growth by midkine-antisense oligonucleotide-loaded nanoparticles. *World J Gastroenterol.* 15:1966-72.
- De Brouwer, S., K. De Preter, C. Kumps, P. Zabrocki, M. Porcu, E.M. Westerhout, A. Lakeman, J. Vandesompele, J. Hoebeeck, T. Van Maerken, A. De Paepe, G. Laureys, J.H. Schulte, A. Schramm, C. Van Den Broecke, J. Vermeulen, N. Van Roy, K. Beiske, M. Renard, R. Noguera, O. Delattre, I. Janoueix-Lerosey, P. Kogner, T. Martinsson, A. Nakagawara, M. Ohira, H. Caron, A. Eggert, J. Cools, R. Versteeg, and F. Speleman. 2011. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin Cancer Res.* 16:4353-62.
- George, R.E., T. Sanda, M. Hanna, S. Frohling, W. Luther, 2nd, J. Zhang, Y. Ahn, W. Zhou, W.B. London, P. McGrady, L. Xue, S. Zozulya, V.E. Gregor, T.R. Webb, N.S. Gray, D.G. Gilliland, L. Diller, H. Greulich, S.W. Morris, M. Meyerson, and A.T. Look. 2008. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature.* 455:975-8.
- Ikematsu, S., A. Nakagawara, Y. Nakamura, S. Sakuma, K. Wakai, T. Muramatsu, and K. Kadomatsu. 2003. Correlation of elevated level of blood midkine with poor prognostic factors of human neuroblastomas. *Br J Cancer.* 88:1522-6.
- Janoueix-Lerosey, I., D. Lequin, L. Brugieres, A. Ribeiro, L. de Pontual, V. Combaret, V. Raynal, A. Puisieux, G. Schleiermacher, G. Pierron, D. Valteau-Couanet, T. Frebourg, J. Michon, S. Lyonnet, J. Amiel, and O. Delattre. 2008. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature.* 455:967-70.
- Janoueix-Lerosey, I., G. Schleiermacher, and O. Delattre. 2010. Molecular pathogenesis of peripheral neuroblastic tumors. *Oncogene.* 29:1566-79.
- Jin, Z., G. Lahat, B. Korchin, T. Nguyen, Q.S. Zhu, X. Wang, A.J. Lazar, J. Trent, R.E. Pollock, and D. Lev. 2008. Midkine enhances soft-tissue sarcoma growth: a possible novel therapeutic target. *Clin Cancer Res.* 14:5033-42.
- Kadomatsu, K., and T. Muramatsu. 2004. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett.* 204:127-43.
- Kaifi, J.T., H.C. Fiegel, S.L. Rafnsdottir, K. Aridome, P.G. Schurr, U. Reichelt, R. Wachowiak, H. Kleinhaus, E.F. Yekebas, O. Mann, K. Ichihara-Tanaka, T. Muramatsu, D. Kluth, T. Strate, and J.R. Izbicki. 2007. Midkine as a prognostic marker for gastrointestinal stromal tumors. *J Cancer Res Clin Oncol.* 133:431-5.

- Konishi, N., M. Nakamura, S. Nakaoka, Y. Hiasa, M. Cho, H. Uemura, Y. Hirao, T. Muramatsu, and K. Kadomatsu. 1999. Immunohistochemical analysis of midkine expression in human prostate carcinoma. *Oncology*. 57:253-7.
- Kuo, A.H., G.E. Stoica, A.T. Riegel, and A. Wellstein. 2007. Recruitment of insulin receptor substrate-1 and activation of NF-kappaB essential for midkine growth signaling through anaplastic lymphoma kinase. *Oncogene*. 26:859-69.
- Maeda, N., K. Ichihara-Tanaka, T. Kimura, K. Kadomatsu, T. Muramatsu, and M. Noda. 1999. A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta. *J Biol Chem*. 274:12474-9.
- Maeda, S., H. Shintani, H. Kurahara, Y. Mataka, H. Noma, K. Maemura, K. Aridome, T. Yokomine, S. Natsugoe, T. Aikou, and S. Takao. 2007. Clinical significance of midkine expression in pancreatic head carcinoma. *Br J Cancer*. 97:405-11.
- Maehara, H., T. Kaname, K. Yanagi, H. Hanzawa, I. Owan, T. Kinjou, K. Kadomatsu, S. Ikematsu, T. Iwamasa, F. Kanaya, and K. Naritomi. 2007. Midkine as a novel target for antibody therapy in osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 358:757-62.
- Maris, J.M. Recent advances in neuroblastoma. 2010. *N Engl J Med*. 362:2202-11.
- Maris, J.M., M.D. Hogarty, R. Bagatell, and S.L. Cohn. 2007. Neuroblastoma. *Lancet*. 369:2106-20.
- Mazot, P., A. Cazes, M.C. Boutterin, A. Figueiredo, V. Raynal, V. Combaret, B. Hallberg, R.H. Palmer, O. Delattre, I. Janoueix-Lerosey, and M. Vignny. 2011. The constitutive activity of the ALK mutated at positions F1174 or R1275 impairs receptor trafficking. *Oncogene*. 30:2017-25.
- Mishima, K., A. Asai, K. Kadomatsu, Y. Ino, K. Nomura, Y. Narita, T. Muramatsu, and T. Kirino. 1997. Increased expression of midkine during the progression of human astrocytomas. *Neurosci Lett*. 233:29-32.
- Moog-Lutz, C., J. Degoutin, J.Y. Gouzi, Y. Frobert, N. Brunet-de Carvalho, J. Bureau, C. Creminon, and M. Vignny. 2005. Activation and inhibition of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase by monoclonal antibodies and absence of agonist activity of pleiotrophin. *J Biol Chem*. 280:26039-48.
- Mosse, Y.P., M. Laudenslager, L. Longo, K.A. Cole, A. Wood, E.F. Attiyeh, M.J. Laquaglia, R. Sennett, J.E. Lynch, P. Perri, G. Laureys, F. Speleman, C. Kim, C. Hou, H. Hakonarson, A. Torkamani, N.J. Schork, G.M. Brodeur, G.P. Tonini, E. Rappaport, M. Devoto, and J.M. Maris. 2008. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*. 455:930-5.
- Muramatsu, H., K. Zou, N. Sakaguchi, S. Ikematsu, S. Sakuma, and T. Muramatsu. 2000. LDL receptor-related protein as a component of the midkine receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 270:936-41.
- Muramatsu, T. Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. 2010. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 86:410-25.



- Nakagawara, A., J. Milbrandt, T. Muramatsu, T.F. Deuel, H. Zhao, A. Cnaan, and G.M. Brodeur. 1995. Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas. *Cancer Res.* 55:1792-7.
- Nakanishi, T., K. Kadomatsu, T. Okamoto, K. Ichihara-Tanaka, T. Kojima, H. Saito, Y. Tomoda, and T. Muramatsu. 1997. Expression of syndecan-1 and -3 during embryogenesis of the central nervous system in relation to binding with midkine. *J Biochem.* 121:197-205.
- O'Brien, T., D. Cranston, S. Fuggle, R. Bicknell, and A.L. Harris. 1996. The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res.* 56:2515-8.
- Papadimitriou, E., A. Polykratis, M. Hatzia Apostolou, A. Parthymou, C. Polytarchou, and C. Mikelis. 2004. Heparin affin regulatory peptide: a new target for tumour therapy? *Curr Cancer Drug Targets.* 4:471-82.
- Passoni, L., L. Longo, P. Collini, A.M. Coluccia, F. Bozzi, M. Podda, A. Gregorio, C. Gambini, A. Garaventa, V. Pistoia, F. Del Grosso, G.P. Tonini, M. Cheng, C. Gambacorti-Passerini, A. Anichini, F. Fossati-Bellani, M. Di Nicola, and R. Luksch. 2009. Mutation-independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis neuroblastoma patients. *Cancer Res.* 69:7338-46.
- Perel, Y., D. Valteau-Couanet, J. Michon, F. Lavrand, C. Coze, C. Bergeron, A. Notz, D. Plantaz, P. Chastagner, F. Bernard, C. Thomas, and H. Rubie. 2004. [Prognosis of neuroblastoma in childhood. Methods of assessment and clinical use]. *Arch Pediatr.* 11:834-42.
- Pistoia, V., G. Bianchi, G. Borgonovo, and L. Raffaghello. 2011. Cytokines in neuroblastoma: from pathogenesis to treatment. *Immunotherapy.* 3:895-907.
- Reiff, T., L. Huber, M. Kramer, O. Delattre, I. Janoueix-Lerosey, and H. Rohrer. 2011. Midkine and Alk signaling in sympathetic neuron proliferation and neuroblastoma predisposition. *Development.* 138:4699-708.
- Sakaguchi, N., H. Muramatsu, K. Ichihara-Tanaka, N. Maeda, M. Noda, T. Yamamoto, M. Michikawa, S. Ikematsu, S. Sakuma, and T. Muramatsu. 2003. Receptor-type protein tyrosine phosphatase zeta as a component of the signaling receptor complex for midkine-dependent survival of embryonic neurons. *Neurosci Res.* 45:219-24.
- Satkauskas, S., M.F. Bureau, M. Puc, A. Mahfoudi, D. Scherman, D. Miklavcic, and L.M. Mir. 2002. Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: respective contributions of cell electropermeabilization and DNA electrophoresis. *Mol Ther.* 5:133-40.
- Schulte, J.H., H.S. Bachmann, B. Brockmeyer, K. Depreter, A. Oberthur, S. Ackermann, Y. Kahlert, K. Pajtler, J. Theissen, F. Westermann, J. Vandesompele, F. Speleman, F. Berthold, A. Eggert, B. Brors, B. Hero, A. Schramm, and M. Fischer. 2011. High ALK receptor tyrosine kinase expression supersedes ALK mutation as a determining factor of an unfavorable phenotype in primary neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 17:5082-92.

- Stoica, G.E., A. Kuo, A. Aigner, I. Sunitha, B. Souttou, C. Malerczyk, D.J. Caughey, D. Wen, A. Karavanov, A.T. Riegel, and A. Wellstein. 2001. Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *J Biol Chem.* 276:16772-9.
- Stoica, G.E., A. Kuo, C. Powers, E.T. Bowden, E.B. Sale, A.T. Riegel, and A. Wellstein. 2002. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem.* 277:35990-8.
- Takei, Y., K. Kadomatsu, S. Matsuo, H. Itoh, K. Nakazawa, S. Kubota, and T. Muramatsu. 2001. Antisense oligodeoxynucleotide targeted to Midkine, a heparin-binding growth factor, suppresses tumorigenicity of mouse rectal carcinoma cells. *Cancer Res.* 61:8486-91.
- Tanabe, K., M. Matsumoto, S. Ikematsu, S. Nagase, A. Hatakeyama, T. Takano, H. Niikura, K. Ito, K. Kadomatsu, S. Hayashi, and N. Yaegashi. 2008. Midkine and its clinical significance in endometrial carcinoma. *Cancer Sci.* 99:1125-30.
- Vacherot, F., D. Caruelle, D. Chopin, S. Gil-Diez, D. Barritault, J.P. Caruelle, and J. Courty. 1999. Involvement of heparin affin regulatory peptide in human prostate cancer. *Prostate.* 38:126-36.
- Whiteford, C.C., S. Bilke, B.T. Greer, Q. Chen, T.A. Braunschweig, N. Cenacchi, J.S. Wei, M.A. Smith, P. Houghton, C. Morton, C.P. Reynolds, R. Lock, R. Gorlick, C. Khanna, C.J. Thiele, M. Takikita, D. Catchpoole, S.M. Hewitt, and J. Khan. 2007. Credentialing preclinical pediatric xenograft models using gene expression and tissue microarray analysis. *Cancer Res.* 67:32-40.
- Xu, Z., E. Bouman-Thio, C. Comisar, B. Frederick, B. Van Hartingsveldt, J.C. Marini, H.M. Davis, and H. Zhou. 2011. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of a human anti-IL-6 monoclonal antibody (sirukumab) in healthy subjects in a first-in-human study. *Br J Clin Pharmacol.* 72:270-81.

## Partie . 2 Etude phénotypique du modèle de résistance

### Présentation de l'article 3 : Acquired *in vivo* resistance to irinotecan in neuroblastoma is associated with genetic instability and quiescence

Les neuroblastomes de haut risque restent particulièrement difficiles à prendre en charge et sont associés à des taux de survie faible. Ces tumeurs deviennent fréquemment résistantes à la chimiothérapie et il est primordial d'identifier des marqueurs de réponse au traitement et de proposer des combinaisons thérapeutiques visant à potentialiser l'efficacité des thérapies actuelles. Les inhibiteurs de topoisomérase I sont des médicaments majeurs de la prise en charge des neuroblastomes de haut risque. En revanche, leur efficacité est faible en monothérapie et limitée par l'acquisition de phénomènes de résistance. Pour étudier les phénomènes de résistance acquis dans un contexte thérapeutique, un modèle original de neuroblastome résistant à l'irinotecan (CPT-11) a été développé *in vivo*. Précédemment, il a été montré au laboratoire que les mécanismes « classiquement » à l'origine de la résistance aux inhibiteurs de topoisomérase I et majoritairement décrits *in vitro*, n'étaient pas impliqués dans notre modèle *in vivo* (Calvet et al., 2004 et 2006). Ceci renforce l'intérêt de développer des modèles expérimentaux de résistance *in vivo*. Ceci nous a également incités à mettre en place une stratégie expérimentale mécanistique visant à identifier et localiser des mécanismes « originaux » associés à la résistance. Nous avons comparé dans les tumeurs sensibles et résistantes les événements majeurs induits par le CPT-11, particulièrement le déclenchement de l'apoptose et les événements nucléaires liés à la formation des dommages à l'ADN.

Par western blot et étude immunohistochimique, nous avons évalué les changements moléculaires (clivage de PARP-1) et morphologiques associés au processus apoptotique. Nous avons également suivi les marqueurs de l'activité pharmacologique et de l'efficacité du CPT-11 : la formation des complexes de clivage et des cassures de l'ADN a été étudiée par slot blot et par comet assay, respectivement. De plus, le recrutement et l'activation d'acteurs clé de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN, impliqués dans la signalisation des dommages ( $\gamma$ -H2AX et P-ATM), dans la réparation des dommages (RAD52) ou dans les points de contrôle du cycle cellulaire (P-Chk1) ont été suivis par Western blot. Enfin la distribution des cellules dans le cycle cellulaire et le taux de prolifération des tumeurs ont été analysés par cytométrie en flux (marquage avec l'iodure de propidium et un anticorps anti-Ki67).

Les résultats obtenus montrent que plusieurs événements cellulaires clés dans la réponse au CPT-11 sont altérés. Nous avons mis en évidence l'accumulation de complexes de clivage et

de dommages à l'ADN dans les tumeurs résistantes à l'état basal. De façon intéressante, la signalisation de ces dommages est altérée, l'activation de  $\gamma$ -H2AX et de la voie de signalisation p53 est totalement absente et ceci pourrait permettre la « tolérance » des dommages. D'autre part, nous avons observé l'activation d'une protéine clé de contrôle du cycle cellulaire, Chk1. La répartition des cellules dans le cycle cellulaire est altérée avec un arrêt important des cellules en G2/M et une proportion importante de cellules quiescentes.

L'administration répétée de CPT-11 a probablement entraîné un endommagement basal de l'ADN qui semble induire l'accumulation des complexes de clivage. L'augmentation de ces lésions à l'état basal limite l'activité pharmacologie normale du CPT-11. D'autre part, la tolérance des dommages (causée par l'absence de leur signalisation), associée à un arrêt des cellules en phase G2/M et une diminution du taux de prolifération pourraient expliquer la résistance des cellules au CPT-11.

## **I. Article 3: Acquired *in vivo* resistance to irinotecan in neuroblastoma is associated with genetic instability and quiescence**

### **1. Introduction**

Neuroblastoma is one of the most common solid tumors in childhood. The prognosis of this tumor is remarkably variable, ranging from favorable cases that can regress spontaneously to high risk cases that often become refractory to treatment. Those cases are particularly difficult to treat and will often enter clinical trials to benefit from innovative therapeutic strategies. Notably, topoisomerase I inhibitors have shown an interesting efficacy against neuroblastoma preclinical models (Houghton et al., 1995 ; Vassal et al., 1997 ; Thompson et al., 1997). Subsequently, their clinical development are very promising in high risk neuroblastoma in association with other therapies (London et al., 2010 ; Bagatell et al., 2011 ; Hartmann et al., 2011).

The topoisomerase I inhibitors, irinotecan (CPT-11) and topotecan are amongst the most efficient anticancer drugs (Zunino and Pratesi, 2004) and approved by the Food and Drug Administration to treat a variety of malignancies. They belong to the camptothecin family and target the fundamental nuclear enzyme DNA topoisomerase I. Their antitumor activity is ascribed to their ability to stabilize the covalent DNA–topoisomerase I cleavage complex

(Top1cc), physiologically very transient. A variety of DNA lesions can stabilize Top1cc (Pourquier et al., 1997 (a) ; 1997 (b) ; 1999 ). The collision of the Top1cc with the machinery of transcription or mostly of replication, led to the formation of DNA double-strand breaks (DSB) (Sordet et al., 2009 ; Sordet et al., 2010 ; Pommier et al., 2010), which are especially lethal for cells. If the capacities of DSB repair are overcome, cells will initiate an apoptotic response.

Efficacy of these drugs is often limited by the problem of resistance (Pourquier and Lansiaux, 2011). A better understanding of these mechanisms is necessary to identify biomarkers predicting tumor response to these drugs and to propose innovative combinatorial treatments. We previously established and described an original *in vivo* neuroblastoma model, IGR-NB8-R, resistant to CPT-11. IGR-NB8-R derives from the CPT-11-sensitive IGR-NB8 tumor, through a non classical resistance mechanism (Calvet et al., 2004). Remarkably resistance is induced by sequential and repeated administration of CPT-11 and is reversible after treatment is stopped. The characterization of IGR-NB8-R revealed no overexpression of the main MDR transporters (MDR1, MRP1 and BCRP), no alteration of the topoisomerase I regarding its catalytic activity, sequence and protein expression (Calvet et al., 2004). In the present study, we further characterized the DNA damage response (DDR) upon CPT-11 administration in IGR-NB8 and IGR-NB8-R. In the resistant tumors, DNA damage signaling is deficient and enables the accumulation and tolerance of high level of damage at baseline. Remarkably, P-Chk1 is activated and the proportion of quiescent cells is increased in IGR-NB8-R.

## **2. Materials and methods**

### **Animals and xenografts**

Swiss nu/nu athymic mice 6-8 weeks old were transplanted subcutaneously with either IGR-NB8 or IGR-NB8-R xenografts. IGR-NB8-R xenografts resistant to CPT-11 were previously established in the laboratory (Calvet et al., 2004). CPT-11 was injected intravenously in caudal vein at dose of 40 mg/kg (maximal tolerated dose) in mice bearing tumors measuring 100-300 mm<sup>2</sup>. For irradiation, a total body irradiation was performed at 5 Grays delivered in on time. Mice were sacrificed at different time points and tumors frozen at -80°C for further analyses.

### **Protein extraction**

For western blot analyses frozen tumors were lysed by ultraturrax homogenisator in TNEN buffer (50 mM TrisHCl, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA and 1% NP-40) for extraction of total proteins (for PARP-1 and p53 detection). For nuclear proteins extraction two buffers were used : a hypotonic buffer containing 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol and subsequently a hypertonic buffer containing 20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 10% (v/v) glycerol, 0.6% (v/v) NP-40) (for all other proteins). For histone detection, an urea buffer was used (50mM Tris pH=7.4, 150mM  $\beta$ -mercapthoethanol, 8 M urea). In each case, inhibitors of proteases (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) and phosphatases (1 mM NaF; 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, Sigma Aldrich) were added.

### **DNA isolation for Top1cc detection**

Frozen tissue (25-50mg) was lysed with 1 ml of chilled DNazol (Invitrogen) using a Wheaton Dounce Tissue Grinder (15 mL, tight) and centrifuged (10 000xg, 10 min, 4°C). DNA extraction was then performed using manufacturer's instructions and the method described by Pfister et al., 2009. Supernatant was collected and 100% ethanol (at room temperature) was added to the supernatant. Supernatant with added ethanol was incubated overnight in 20 °C to precipitate DNA. On the next day, precipitated DNA was centrifuged (10 000xg, 10 min, 4°C). Supernatant was discarded and pellet was washed with 75% ethanol (at room temperature). Supernatant was discarded again and pellet was solubilised in 8 mM NaOH (at room temperature) and sonicated. DNA concentration was measured by Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific).

### **Western immunoblotting**

50 ug of proteins were separated by SDS-PAGE and transferred into nitrocellulose membrane. Protein detection was performed using the following primary antibodies: anti-p53 (Dako, Glostrup), anti-p21 (Calbiochem), anti-mdm2 (Calbiochem), anti-PARP-1(Calbiochem), anti- $\gamma$ -H2Ax (Ser139) (Millipore), anti-P-ATM (Cell signaling), anti-Rad52 (Cell signaling, ), anti-P-Chk1 (Cell signaling), anti-H2A (Cell signaling), anti-H3 (Abcam), anti- $\beta$ -actin (Sigma Aldrich) and appropriate anti-mouse or –rabbit secondary antibodies (GE Healthcare). Signals were detected using chemiluminescent substrates (Pierce or Millipore).

### **Slot blotting**

DNA isolated using DNazol were adsorbed on PVDF membranes, which were previously activated by soaking for 10 seconds in ethanol and 10 minutes in water then washed twice in PBS-Tween buffer (PBS + 0,2% Tween-20). Using a slot blot filtration manifold unit (Hofer), each DNA samples were putted at three dilutions (1,2 ; 0,6 and 0,3 ug). After several washes in PBS-Tween buffer, membranes were incubated in the blocking solution (5% nonfat milk). Topoisomerase I detection was performed using the following primary antibody (Purified Mouse Anti-Human DNA Topoisomerase I monoclonal Ab (BD Biosciences)) and the following secondary antibody (anti-mouse IgG HorseRadish-Peroxidase (HRP)-Linked). Detection was performed using chemiluminescent substrate (Pierce or Millipore).

### **Alkaline Single-Cell Gel Electrophoresis assay (Comet Assay)**

In this study, the Alkaline Comet Assay was performed using the Trevigen's CometAssay® kit (Trevigen Inc.) following manufacturer's instructions. The alkaline variant allows to extend the range of damage that can be detected. Non-treated and treated IGR-NB8 and IGR-NB8-R tumors, frozen at -80°C in 1 mL medium, containing 10% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO), 50% (v/v) Fetal Calf Serum (FCS) and 40% (v/v) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) were thawed in 37°C water bath and minced into small pieces. They were then filtered, centrifuged and resuspended in ice cold Phosphate Buffered Saline (PBS) (Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> free). 500 cells are immobilized in agarose onto microscope glass slides. Slides were immersed in the provided Lysis solution (containing detergents and high salt). Slides were then placed in the alkaline unwinding Solution (pH>13). They were then submitted to an electric field and DNA was finally visualized using an epifluorescence microscope equipped with Fluorescein filter (Zeiss Axiovert S100 Inverted Fluorescence Microscope) after SYBR® Green staining. Comets photos were taken and saved using high-resolution Zeiss AxioCam HRc digital camera, linked to the microscope, and Zeiss AxioVision 4.6 software. The comets images were scored with the TriTek Comet Score™ version 1.5 software. At least 15-20 cells per sample were selected. The percentages of DNA in tail were in particular examined.

### **Cell cycle analysis by Fluorescence-Activated Cell Sorting**

Treated and non-treated IGR-NB8 and IGR-NB8-R tumors were minced in ice cold PBS into pieces and filtered in centrifuge tubes. Cell suspensions were centrifuged (10 minutes, 12500

r.p.m.). Samples were kept in ~1 mL ethanol 70% (v/v) at -20°C over night to fix and permeabilize cells. Pellets were then incubated at 4°C for 1 hour with rabbit anti-human Ki-67 Antibody or PBS for the negative control. Incubation with FITC-conjugated anti-rabbit IgG antibody was then performed at 4°C for 1 hour for each sample. Finally, cells were resuspended in 200 µL colouring solution, containing propidium iodid (2.5 mg/mL). Propidium iodide and FITC fluorescence were analysed using FACSCalibur flow cytometer and CellQuest Pro software (BD Bioscience).

### **Densitometry and statistical analysis**

Densitometric quantification of slot blot bands was performed using Image J Software. The differences in the % of DNA in the tail were evaluated for significance using a Mann-Whitney test. The analyses were performed by GraphPad Prism 3 software. \* means  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ .

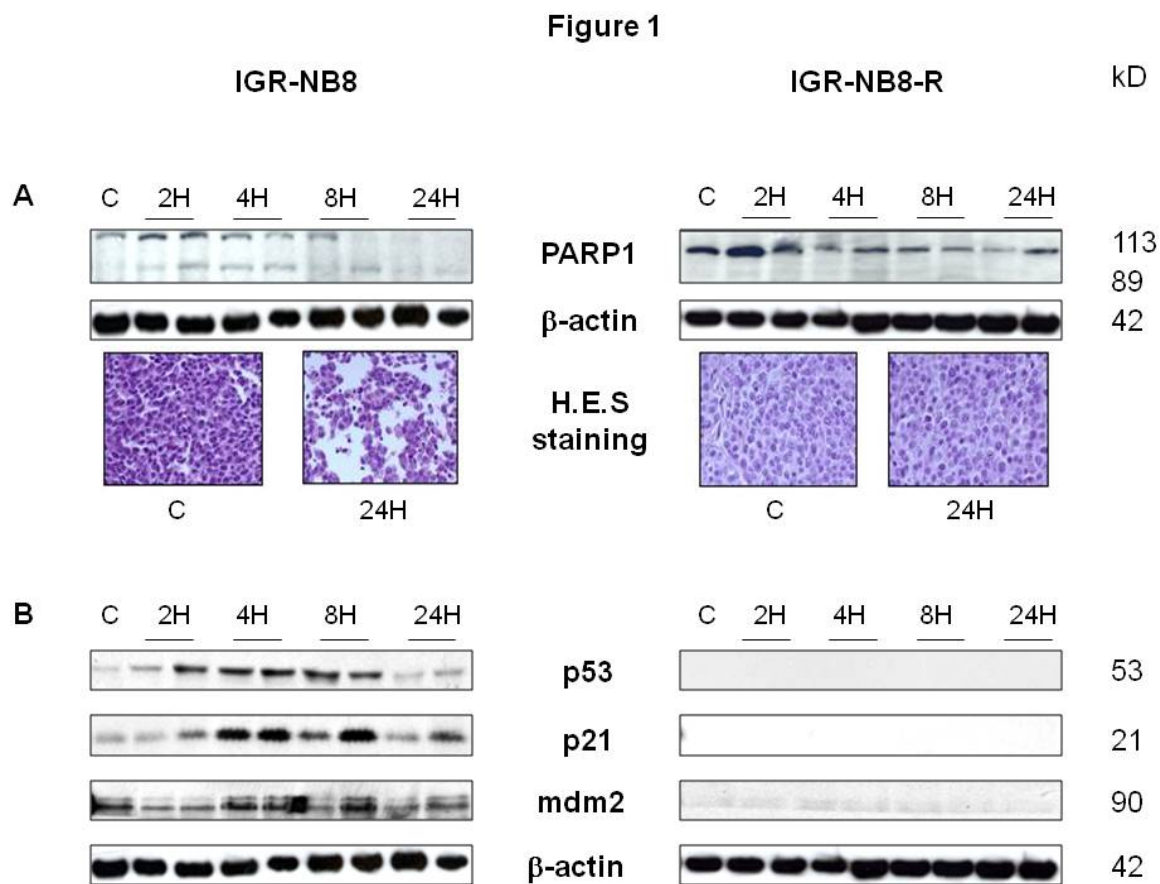
## **3. Results**

### **CPT-11 fails to stimulate apoptosis-inducing signal in IGR-NB8-R**

CPT-11 is a major inducer of the apoptotic process culminating with PARP-1 cleavage. Through western blot analysis, we observed that CPT-11 induced PARP-1 cleavage in IGR-NB8, 2 hours after the treatment (Fig. 1A). The detection of the cleaved fragment (89 kD) increased within time (Fig. 1A). However PARP-1 was not cleaved in IGR-NB8-R after CPT-11 treatment. We could only notice an increase of PARP-1 whole protein (113 kD) 2 hours after CPT-11 injection (Fig. 1A). We also conducted Hematoxylin, Eosin, Safran (HES) staining to observe the morphological changes induced by CPT-11. While CPT-11 led to a reduction of the cell number and cohesion in IGR-NB8, no modification of the amount and morphology of cells could be observed in IGR-NB8-R. Finally, we analyzed the p53 pathway, which is a crucial component of the DDR. One of its numerous functions is to initiate apoptosis when repair capacities of cells are overcome. Using Western-blot analyses, we evaluated the stabilization of p53 and its downstream targets (p21, Mdm2). In IGR-NB8, p53 accumulated from 2 hours after CPT-11 treatment and is stabilized between 4 and 8 hours post-injection (Fig. 1B). After 24 hours, the level of p53 reached the basal level again (Fig. 1B). Moreover the accumulation of p53 was associated with an up regulation of its downstream effectors (p21 and Mdm2) (Fig. 1B), reflecting the transcriptional activity of p53



in IGR-NB8. In IGR-NB8-R xenografts, there is an alteration of p53 signaling either before or after injection of CPT-11 (Fig. 1B). Thus, we demonstrated that CPT-11 fails to initiate apoptosis in IGR-NB8-R. Nevertheless, it is worthy to note that the cell death mechanisms remain functional since we proved that IGR-NB8-R tumors are sensitive to alkylating and platinating agents (Calvet et al., 2004).



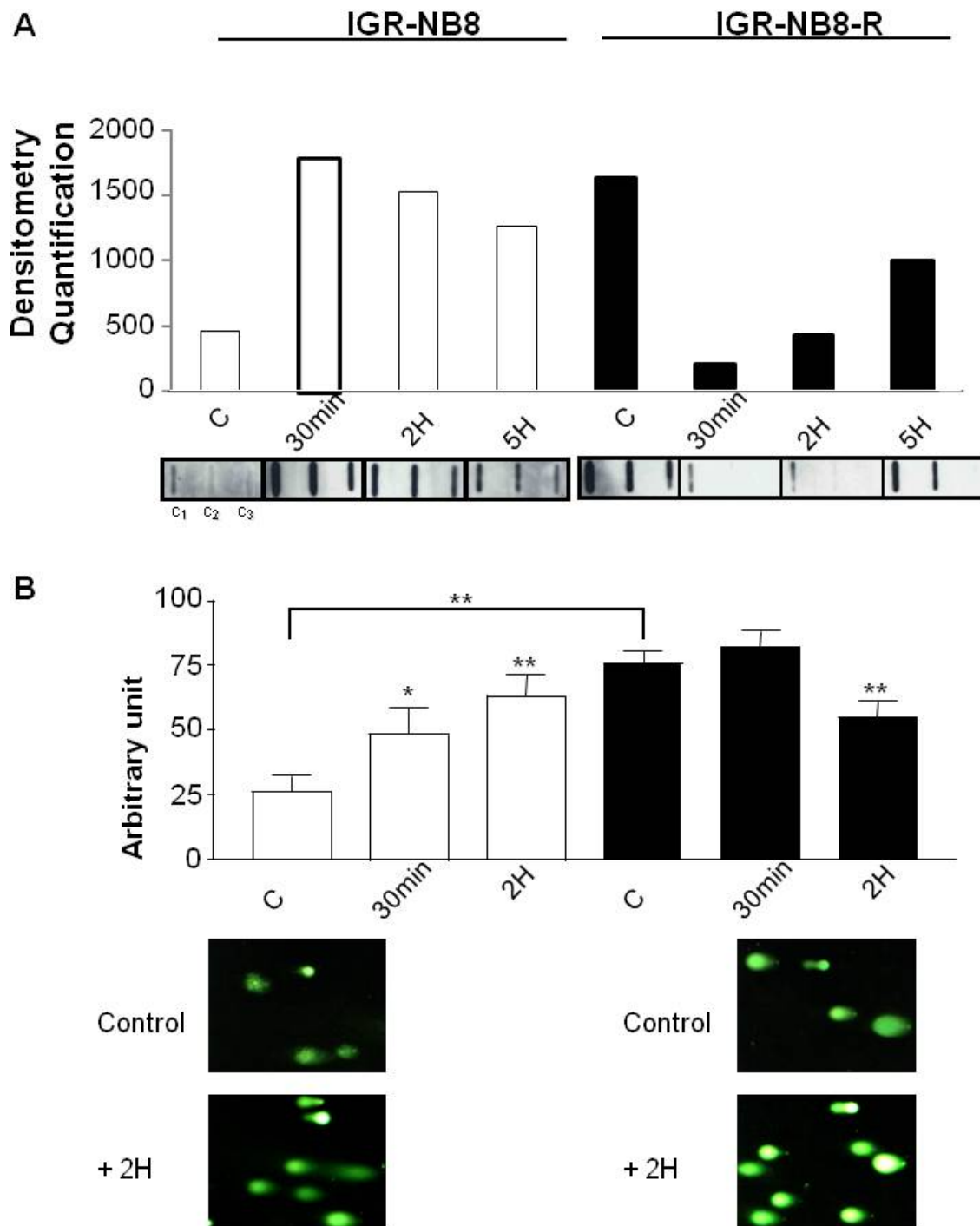
**Figure 1 – p53 pathway is not recruited and PARP-1 is not cleaved in IGR-NB8-R.**  
 (A) Evaluation of PARP-1 cleavage through western blot analysis (B) Evaluation of p53 and its downstream effectors through western blot analysis

### CPT-11 fails to increase the Top1cc and DNA damage basal levels in IGR-NB8-R

We further evaluated whether CPT-11 exerts its pharmacological activity. Stabilization of Top1cc and their conversion in DSB are crucial for a good efficacy of the drug. We measured Top1cc stabilization in IGR-NB8 and IGR-NB8-R after CPT-11 administration using a slot blot technique (see materials and methods). As expected, CPT-11 led to a high increase of Top1cc in IGR-NB8. It was maximal 30 minutes after injection of CPT-11 and then decreased until 5 hours (Fig. 2A). Surprisingly, Top1cc were already highly stabilized in IGR-NB8-R at

the basal level (Fig. 2A), this amount were as high as in IGR-NB8 tumors 30 minutes post-injection. In IGR-NB8-R Top1cc level decreased 30 minutes after CPT-11 administration and increased again from 2 to 5 hours to tend towards the basal level (Fig. 2A). We further compared the level of DNA damage in IGR-NB8 and IGR-NB8-R before and after CPT-11 administration. We performed an alkaline comet assay, measuring both simple and double-strand breaks in DNA of individual cells. The results, expressed as the tail moment values, demonstrated that CPT-11 induced a significant increase of the DNA damage 2 hours after CPT-11 administration in IGR-NB8 ( $p < 0,001$ ) (Fig. 2B). In IGR-NB8-R, a high level of DNA damage was already detected at basal level. This level could not be significantly increased by CPT-11 (Fig. 2B). On the contrary, 2 hours after CPT-11 injection, the amount of DNA damage decreased significantly (Fig. 2B). We demonstrated that CPT-11 fails to exert a normal pharmacological activity in IGR-NB8-R.

Figure 2

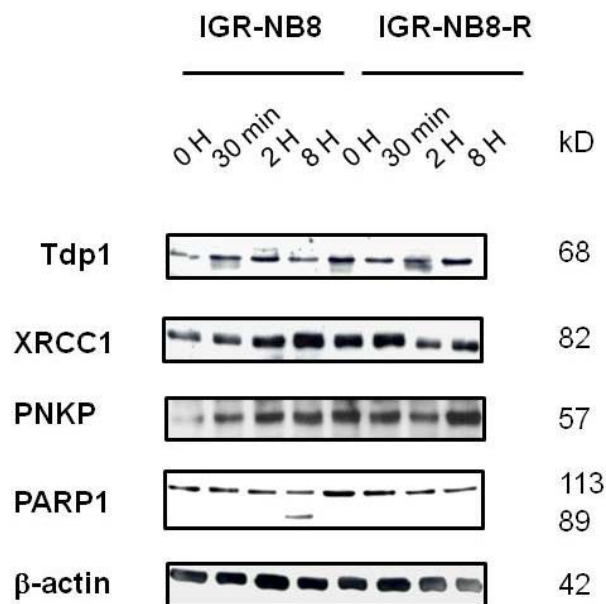


**Figure 2 – High basal amounts of Top1cc and DNA damage are not increased upon CPT-11 administration in IGR-NB8-R**

(A) Topoisomerase I trapping was monitored by evaluating the presence of the enzyme through slot blot analysis in DNA extracts from IGR-NB8 (white bars) and IGR-NB8-R (black bars) (B) Alkaline Comet Assay was used to determine DNA damage in IGR-NB8 cells (white bars) and IGR-NB8-R (black bars). Error bars are SEM, \*  $p < 0,05$  and \*\*  $P < 0.01$  were calculated using a Mann-Whitney test.

### Top1cc removal capacity is increased in IGR-NB8-R

Persistent Top1cc are not compatible with the normal replication of cells and one should suggest that mechanisms removing those complexes are overexpressed. We evaluated the recruitment of the Tdp1/BER pathway (XRCC1, PNKP and PARP-1) able to remove a variety of covalent adducts from DNA, including Top1cc. In contrast to PARP-1's role as an inducer of cell death, PARP-1 also participates in numerous DNA repair mechanisms to promote cell survival. The western blot revealed a recruitment of this pathway in IGR-NB8 after CPT-11 injection, particularly PNKP and XRCC1 from 30 min until 8 hours after injection (Fig.3). The accumulation of Tdp1 is less pronounced and less prolonged in the time (Fig. 3). PARP-1 seems not to be involved in DNA lesions repair in IGR-NB8, since we can only detect its cleavage after 8 hours (Fig. 3), indicating the establishment of the apoptotic response. In IGR-NB8-R control xenografts, the amount of each protein is already elevated, higher than their amount in IGR-NB8 control xenografts (Fig. 3). After CPT-11 injection, XRCC1 and PNKP levels are increased after 30 minutes and 8 hours, respectively. Finally, we demonstrated that both trapping and removing of Top1cc are increased in IGR-NB8-R.



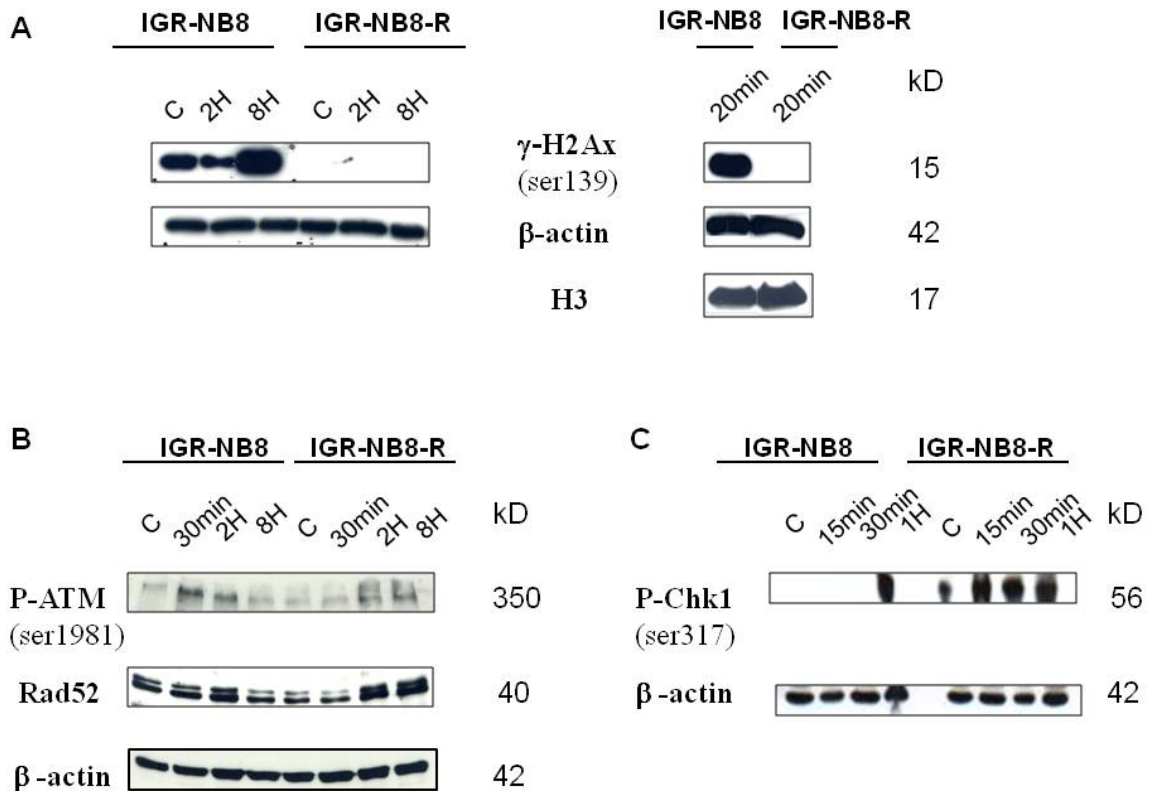
**Figure 3 –The Tdp1/BER pathway is overexpressed in IGR-NB8-R**

The expression of TDP1 and BER actors were evaluated using western blot analyses.β-actin was used as loading control.

### **Baseline DNA damage are not signaled and P-Chk1 is highly activated in IGR-NB8-R**

In order to better understand the accumulation of DNA damage in IGR-NB8-R non-treated tumors, we examined DNA damage signaling and repair mechanism. The activation of H2AX (named  $\gamma$ -H2AX), is a major event following DNA damage formation, essentially DSB. Western blot analysis revealed an increase of  $\gamma$ -H2AX upon CPT-11 administration in IGR-NB8 (Fig. 4A). The activated protein was already observed at basal level and stimulated after CPT-11 injection, particularly after 8 hours (Fig. 4A). In contrast,  $\gamma$ -H2AX could not be detected in IGR-NB8 R neither at basal level nor after CPT-11 injection (Fig. 4A). We further irradiated the tumors to induce DSB in a direct manner. Interestingly,  $\gamma$ -H2Ax was detected 20 minutes after irradiation in IGR-NB8 while it was still not detected in IGR-NB8-R (Fig.4A).  $\gamma$ -H2AX plays a central role of the DDR by recruiting and organizing DNA repair and cell cycle arrest factors. Using Western blot analysis, we monitored the activation of crucial actors of the DDR, involved either in damage signaling (P-ATM, which activates H2AX), repair (rad52) or cell cycle checkpoints (P-Chk1). As expected those actors were stimulated in IGR-NB8 at different time point after CPT-11 (Fig. 4 B and C). Those results could be correlated with an increase of DNA damage detected in IGR-NB8 (Fig. 2B). In IGR-NB8-R, although DNA damage accumulated at basal level, P-ATM and Rad52 were not stimulated at baseline (Fig.4B). However they were surprisingly up regulated after CPT-11 injection in IGR-NB8-R (Fig. 4B). Interestingly, P-Chk1 is already detectible at basal level and strongly stimulated by CPT-11 at early time point (from 15 minutes) in the resistant tumors while it was only detectible after 1 hour in the sensitive tumors (Fig. 4C). All together these data showed an absence of  $\gamma$ -H2Ax and an increase of Chk1 activation in IGR-NB8-R.

**Figure 4**



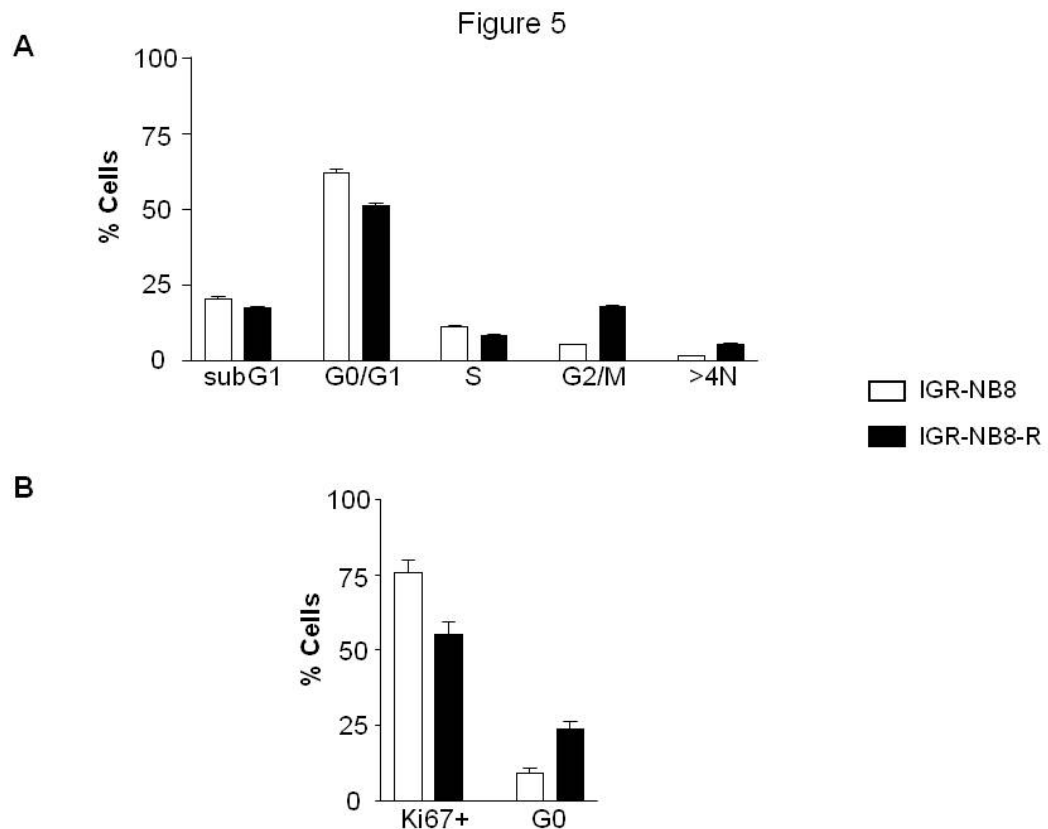
**Figure 4 – $\gamma$ -H2AX signaling is altered and Chk1 activated in IGR-NB8-R**

The expression or activation of several DDR actors were evaluated using western blot analyses.  $\beta$ -actin and H3 were used as loading and chromatin extraction controls, respectively (A) Detection of  $\gamma$ -H2AX (ser139) after CPT-11 injection (panel on left) and after irradiation (panel on right) (B) Detection of P-ATM (ser1981) and Rad52 (C) Detection of P-Chk1 (ser317).

**The proliferation rate is lowered in IGR-NB8-R.**

The activation of Chk1 suggests an alteration in the cell cycle progression in IGR-NB8-R. We compared the cell cycle distribution and the proportion of Ki67 positive cells through flow cytometry. The data showed a slight arrest of IGR-NB8-R cells in S-phase (8,6 % in IGR-NB8-R and 11,3 % in IGR-NB8) (Fig. 5) and a major arrest in G2/M-phase (18,1 % in IGR-NB8-R and 5,4% in IGR-NB8). In addition, IGR-NB8-R cells were less distributed in G0/G1-phases compared to IGR-NB8 cells (51,2 % in IGR-NB8-R and 62 % in IGR-NB8) (Fig. 5). Finally a higher percentage of cells with a DNA content >4N (polyploid cells) was observed in the resistant sample (5,6% in IGR-NB8-R and 1,7 % in IGR-NB8) (Fig.5). Finally, we noticed a reduction of the proportion of proliferating cells in IGR-NB8-R. Indeed 55,1 % of

cells expressed Ki67 in IGR-NB8-R compared to 75,8 % in IGR-NB8 (Fig.5). We then deduced that 9,3 % and 23,9 % of cells were distributed in G0-phase in the sensitive and resistant sample, respectively (Fig.5). All these findings confirmed that the resistant IGR-NB8-R cells proliferate less than the sensitive IGR-NB8 ones and exhibit a higher proportion of quiescent cells.



**Figure 5 –The cell cycle distribution and the proportion of proliferating cells are altered in IGR-NB8-R**

After staining with propidium iodide, cell distribution in the cell cycle was evaluated by flow cytometry. **(B)** After co-staining with propidium iodide and/or Ki67, cell distribution in the cell cycle was evaluated by flow cytometry.

## 4. Discussion

The camptothecin derivative irinotecan is largely used for treating patients with several types of malignancies (Pizzolato and Saltz, 2003 ; Pommier, 2006). However, despite an initial response to irinotecan, resistance mechanisms reduce its efficacy. Moreover, when used as a single-agent, this drug cannot always provide a satisfactory curative effect. A thorough understanding of the molecular determinants involved in drug resistance to irinotecan and other topoisomerase I inhibitors is critical. It is essential to propose therapeutic strategies targeting those mechanisms and formulate optimal combinatorial treatment designs (Pommier et al., 2006). To identify original resistance mechanisms of topoisomerase I inhibitors we developed and characterized the CPT-11 resistant model, IGR-NB8-R (Calvet et al., 2004). Resistance is acquired *in vivo* in a therapeutic setting and is reversible when treatment is stopped.

The data obtained in this study illustrate a major difference in CPT-11-mediated DDR between IGR-NB8 and IGR-NB8-R. In IGR-NB8 tumors, CPT-11 increases the level of Top1cc, resulting in the formation of DNA DSB which are correctly signaled and trigger appropriate apoptosis processes. On the contrary, in IGR-NB8-R tumors, CPT-11 fails to enhance the formation of Top1cc and DNA damage, which amounts are already particularly high in non-treated cells. This shows that CPT-11 is unable to exert its pharmacological activity at the molecular level. However, despite we could not detect a significant increase of DNA damage amounts after CPT-11 injection, some crucial actors of the DDR are recruited in IGR-NB8-R. This is associated with a decrease of the baseline amount of damage in DNA of IGR-NB8-R.

Nonetheless, despite the accumulation of high amounts of DNA damage at baseline, neither p53 nor  $\gamma$ -H2AX is recruited in IGR-NB8-R. Although not required absolutely for DDR,  $\gamma$ -H2AX recruits and organizes repair factors (Fernandez-Capetillo et al., 2002 ; Paull et al., 2000). Thus  $\gamma$ -H2AX is a key player in the maintenance of genome stability (Celeste et al., 2003 ; Lowndes and Toh, 2005). Mice deficient for H2AX present increased chromosomal aberrations and increased sensitivity to ionizing radiation (Celeste et al., 2002 ; Bassing et al., 2002). Remarkably, chromosomal instability has been linked to drug resistance and poor prognosis in many solid tumors (Damia and D'Incalci, 2010 ; Lee et al., 2011)



Due to the lack of  $\gamma$ -H2AX, resistant cells might exhibit defective DNA damage repair, resulting in the accumulation of DNA damage, initiation point for chromosomal instability. Moreover alteration of p53 signaling permits cells with persistent DNA injuries and compromised genome integrity to survive inappropriately (Vogelstein et al., 2000 ; Franco et al., 2006).

Interestingly, DNA injuries accumulation could explain the increase of Top1cc in IGR-NB8-R. The presence of DNA damage near the position of enzyme-mediated DNA cleavage can poison the topoisomerase I by trapping it on DNA (Pourquier et al., 1997 ; Kingma and Osheroff, 1998).

In order to survive with such DNA damage, resistant cells have acquired the capacity to tolerate DNA injuries probably through the decrease of their signaling but we also demonstrated that the Tdp1/BER repair pathway is overexpressed particularly at basal level in IGR-NB8-R. Interestingly, these mechanisms act in collaboration to remove DNA adducts, including Top1cc independently of the presence of  $\gamma$ -H2AX or other DSB repair factors.

Moreover, the proliferation rate of resistant cells is lowered and their cell cycle distribution altered. Noteworthy in IGR-NB8-R we noticed an increased proportion of cells distributed in G0, which represents quiescent cells. Resistant cells enter cells S-phase and are more arrested in G2/M phases. It is obvious that such cell cycle alterations, particularly the reduction of proliferating cells are not compatible with a good efficacy of irinotecan, an S-phase cell cycle-specific cytotoxic agent. Interestingly, the kinase Chk1 is activated in IGR-NB8-R at baseline and even more after CPT-11 injection while it is weakly detected 1 hour after CPT-11 in IGR-NB8. This protein is a central mediator of the cell cycle network and induces both S and G2-M phase cell cycle checkpoints in response to DNA damage. Difference in its activation both at baseline and after CPT-11 between IGR-NB8 and IGR-NB8-R underlines the importance of cell cycle regulation in the resistant tumors.

It seems likely that by CPT-11 repeated injection, we rendered cells genetically unstable. Surviving cells have necessarily adapted to this instability through the modulation of DDR, overexpression of Top1cc removing capacity of and cell cycle progression. All together, the features that we described for IGR-NB8-R, principally reduction of  $\gamma$ -H2AX expression, increased genomic instability, deregulation of checkpoint function and quiescence maintenance seem highly connected and characterize aggressive cells.

Finally, these data disclose that the level of DNA damage accumulated/genomic instability and P-Chk1 expression could represent new markers for drug response in neuroblastoma. Moreover our findings support the development of novel treatment strategies designed to reinstate normal cell cycle progression in our model, notably by targeting P-Chk1. Interestingly, this protein was already proposed as a therapeutic target in neuroblastoma (Cole et al., 2011) and it has been demonstrated that the Chk1 inhibitor CHIR-124 potentiates the cytotoxicity of topoisomerase I poisons in vitro and in vivo in breast cancer (Tse et al., 2007). Combining irinotecan with Chk1 inhibitors represents therefore a therapeutic approach particularly interesting for neuroblastoma.

## References

- Bagatell, R., W.B. London, L.M. Wagner, S.D. Voss, C.F. Stewart, J.M. Maris, C. Kretschmar, and S.L. Cohn. 2011. Phase II study of irinotecan and temozolomide in children with relapsed or refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* 29:208–213.
- Bassing, C.H., K.F. Chua, J. Sekiguchi, H. Suh, S.R. Whitlow, J.C. Fleming, B.C. Monroe, D.N. Ciccone, C. Yan, K. Vlasakova, D.M. Livingston, D.O. Ferguson, R. Scully, and F.W. Alt. 2002. Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:8173–8178.
- Calvet, L., A. Santos, A. Valent, M.-J. Terrier-Lacombe, P. Opolon, J.-L. Merlin, G. Aubert, J. Morizet, J.H.M. Schellens, J. Bénard, and G. Vassal. 2004. No topoisomerase I alteration in a neuroblastoma model with in vivo acquired resistance to irinotecan. *Br. J. Cancer.* 91:1205–1212.
- Celeste, A., S. Difilippantonio, M.J. Difilippantonio, O. Fernandez-Capetillo, D.R. Pilch, O.A. Sedelnikova, M. Eckhaus, T. Ried, W.M. Bonner, and A. Nussenzweig. 2003. H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell.* 114:371–83.
- Celeste, A., S. Petersen, P.J. Romanienko, O. Fernandez-Capetillo, H.T. Chen, O.A. Sedelnikova, B. Reina-San-Martin, V. Coppola, E. Meffre, M.J. Difilippantonio, C. Redon, D.R. Pilch, A. Oлару, M. Eckhaus, R.D. Camerini-Otero, L. Tessarollo, F. Livak, K. Manova, W.M. Bonner, M.C. Nussenzweig, and A. Nussenzweig. 2002. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science.* 296:922–927.
- Cole, K.A., J. Huggins, M. Laquaglia, C.E. Hulderman, M.R. Russell, K. Bosse, S.J. Diskin, E.F. Attiyeh, R. Sennett, G. Norris, M. Laudenslager, A.C. Wood, P.A. Mayes, J. Jagannathan, C. Winter, Y.P. Mosse, and J.M. Maris. 2011. RNAi screen of the protein kinome identifies checkpoint kinase 1 (CHK1) as a therapeutic target in neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:3336–3341.
- Damia, G., and M. D'Incalci. 2010. Genetic instability influences drug response in cancer cells. *Curr Drug Targets.* 11:1317–1324.

- Fernandez-Capetillo, O., H.-T. Chen, A. Celeste, I. Ward, P.J. Romanienko, J.C. Morales, K. Naka, Z. Xia, R.D. Camerini-Otero, N. Motoyama, P.B. Carpenter, W.M. Bonner, J. Chen, and A. Nussenzweig. 2002. DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat. Cell Biol.* 4:993–997.
- Franco, S., F.W. Alt, and J.P. Manis. 2006. Pathways that suppress programmed DNA breaks from progressing to chromosomal breaks and translocations. *DNA Repair (Amst.)*. 5:1030–1041.
- Hartmann, C., P. Weinel, H. Schmid, L. Grigull, A. Sander, C. Linderkamp, K. Welte, and D. Reinhardt. 2011. Oxaliplatin, irinotecan, and gemcitabine: a novel combination in the therapy of progressed, relapsed, or refractory tumors in children. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 33:344–349.
- Houghton, P.J., P.J. Cheshire, J.D. Hallman, L. Lutz, H.S. Friedman, M.K. Danks, and J.A. Houghton. 1995. Efficacy of topoisomerase I inhibitors, topotecan and irinotecan, administered at low dose levels in protracted schedules to mice bearing xenografts of human tumors. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 36:393–403.
- Kingma, P.S., and N. Osheroff. 1998. The response of eukaryotic topoisomerases to DNA damage. *Biochim. Biophys. Acta.* 1400:223–232.
- Lee, A.J.X., D. Endesfelder, A.J. Rowan, A. Walther, N.J. Birkbak, P.A. Futreal, J. Downward, Z. Szallasi, I.P.M. Tomlinson, M. Howell, M. Kschischo, and C. Swanton. 2011. Chromosomal instability confers intrinsic multidrug resistance. *Cancer Res.* 71:1858–1870.
- London, W.B., C.N. Frantz, L.A. Campbell, R.C. Seeger, B.A. Brumback, S.L. Cohn, K.K. Matthay, R.P. Castleberry, and L. Diller. 2010. Phase II randomized comparison of topotecan plus cyclophosphamide versus topotecan alone in children with recurrent or refractory neuroblastoma: a Children’s Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 28:3808–15.
- Lowndes, N.F., and G.W.-L. Toh. 2005. DNA repair: the importance of phosphorylating histone H2AX. *Curr. Biol.* 15:R99–R102.
- Paull, T.T., E.P. Rogakou, V. Yamazaki, C.U. Kirchgessner, M. Gellert, and W.M. Bonner. 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* 10:886–895.
- Pizzolato, J.F., and L.B. Saltz. 2003. The camptothecins. *Lancet.* 361:2235–2242.
- Pommier, Y., C. Redon, V.A. Rao, J.A. Seiler, O. Sordet, H. Takemura, S. Antony, L. Meng, Z. Liao, G. Kohlhagen, H. Zhang, and K.W. Kohn. 2003. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutation research.* 532:173–203.
- Pommier, Y. 2006. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature reviews.* 6:789–802.
- Pommier, Y. 2009. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chemical reviews.* 109:2894–902.

Pommier, Y., E. Leo, H. Zhang, and C. Marchand. 2010. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & biology*. 17:421–33.

Pourquier, P., L.M. Ueng, G. Kohlhagen, A. Mazumder, M. Gupta, K.W. Kohn, and Y. Pommier. 1997 (a). Effects of uracil incorporation, DNA mismatches, and abasic sites on cleavage and religation activities of mammalian topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 272:7792–7796.

Pourquier, P., A.A. Pilon, G. Kohlhagen, A. Mazumder, A. Sharma, and Y. Pommier. 1997 (b). Trapping of mammalian topoisomerase I and recombinations induced by damaged DNA containing nicks or gaps. Importance of DNA end phosphorylation and camptothecin effects. *J. Biol. Chem.* 272:26441–26447.

Pourquier, P., L.M. Ueng, J. Fertala, D. Wang, H.J. Park, J.M. Essigmann, M.A. Bjornsti, and Y. Pommier. 1999. Induction of reversible complexes between eukaryotic DNA topoisomerase I and DNA-containing oxidative base damages. 7, 8-dihydro-8-oxoguanine and 5-hydroxycytosine. *J. Biol. Chem.* 274:8516–8523.

Pourquier, P., and Y. Pommier. 2001. Topoisomerase I-mediated DNA damage. *Advances in cancer research*. 80:189–216.

Pourquier, P., and A. Lansiaux. 2011. [Molecular determinants of response to topoisomerase I inhibitors]. *Bull Cancer*. 98:1287–1298.

Sedelnikova, O.A., I. Horikawa, D.B. Zimonjic, N.C. Popescu, W.M. Bonner, and J.C. Barrett. 2004. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 6:168–170.

Sordet, O., C.E. Redon, J. Guirouilh-Barbat, S. Smith, S. Solier, C. Douarre, C. Conti, A.J. Nakamura, B.B. Das, E. Nicolas, K.W. Kohn, W.M. Bonner, and Y. Pommier. 2009. Ataxia telangiectasia mutated activation by transcription- and topoisomerase I-induced DNA double-strand breaks. *EMBO Rep.* 10:887–893.

Sordet, O., A.J. Nakamura, C.E. Redon, and Y. Pommier. 2010. DNA double-strand breaks and ATM activation by transcription-blocking DNA lesions. *Cell Cycle*. 9:274–278.

Thompson, J., W.C. Zamboni, P.J. Cheshire, L. Lutz, X. Luo, Y. Li, J.A. Houghton, C.F. Stewart, and P.J. Houghton. 1997. Efficacy of systemic administration of irinotecan against neuroblastoma xenografts. *Clin Cancer Res.* 3:423–31.

Tse, A.N., K.G. Rendahl, T. Sheikh, H. Cheema, K. Aardalen, M. Embry, S. Ma, E.J. Moler, Z.J. Ni, D.E. Lopes de Menezes, B. Hibner, T.G. Gesner, and G.K. Schwartz. 2007. CHIR-124, a novel potent inhibitor of Chk1, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase I poisons in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* 13:591–602.

Vassal, G., C. Pondarre, C. Cappelli, M.J. Terrier-Lacombe, I. Boland, J. Morizet, J. Benard, A.M. Venuat, P. Ardouin, O. Hartmann, and A. Gouyette. 1997. DNA-topoisomerase I, a new target for the treatment of neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 33:2011–5.

Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine. 2000a. Surfing the p53 network. *Nature*. 408:307–310.

Zunino, F., and G. Pratesi. 2004. Camptothecins in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs*. 13:269–284.

## DISCUSSION GENERALE

Les données présentées dans cette thèse découlent de différents travaux menés à partir de notre modèle de neuroblastome résistant au CPT-11. Plusieurs approches ont été menées pour mieux caractériser ce modèle et nous ont permis d'identifier différents processus impliqués dans l'initiation et la prolifération du neuroblastome ainsi que dans sa réponse au traitement.

Notamment, nous avons identifié la dérégulation de la voie de signalisation régie par le récepteur ALK dans la xéno greffe de neuroblastome chimiorésistante. ALK est exprimé dans la majorité des cas de neuroblastome et son activation est également fréquemment détectée (50% des cas, Regairaz et al., en cours de publication). En revanche, nous avons montré que phospho-ALK est très peu détecté dans les tissus sains, démontrant le rôle de l'activation de ALK dans l'initiation du neuroblastome. De plus, les résultats de l'article 1 montrent que l'activation de ALK est détectée à des niveaux plus élevés dans les cas de neuroblastome favorables, particulièrement les cas diagnostiqués à des âges jeunes. D'autre part, des mutations activatrices de ALK sont retrouvées au niveau germinale. Ces deux informations suggèrent que l'activation de ALK doit être un événement précoce dans l'oncogénèse du neuroblastome. De plus, à ce jour aucune étude n'a démontré d'association entre activation/mutation de ALK et survie des patients. Les mutations de ALK sont distribuées de façon comparable entre les différents stades de la maladie. Ainsi l'activation de ALK serait plutôt un événement précoce lié à l'oncogénèse du neuroblastome plutôt qu'un signal tardif régulant sa progression et l'activation de ALK ne semble pas corrélée avec l'agressivité des tumeurs.

Toutefois, d'après une récente méta-analyse intégrant 709 cas (De Brouwer et al., 2010), il ressort que la mutation F1174L est retrouvée plus fréquemment dans les tumeurs possédant une amplification de N-myc, qui sont des tumeurs de mauvais pronostic. La présence combinée de ces deux altérations génétiques entraîne un pronostic particulièrement mauvais pour les patients. Il a été montré que la présence de mutations de ALK accélère la tumorigénicité induite par N-myc dans un modèle de poisson zèbre (Zhu et al., 2012). De façon remarquable, il a été démontré que ALK pourrait stimuler la transcription de N-myc (Schönherr et al., 2012). Indépendamment de la présence de N-myc, la mutation F1174L

présente un potentiel oncogénique supérieur. Elle est notamment associée à un pouvoir transformant supérieur dans des modèles murins.

Il faut également mentionner un cas très intéressant de neuroblastome qui ne présentait pas d'altération de ALK au diagnostic et pour lequel la mutation F1174S de ALK a été détectée au moment de la progression de la maladie (Martinsson et al., 2011). Une augmentation de l'expression de phospho-ALK a également été associée à l'apparition de cette mutation et ces événements coïncident avec l'apparition d'un phénotype très agressif de la tumeur et un échappement au traitement. Il est important de mentionner que dans cette tumeur la mutation détectée est présente à l'état homozygote alors que dans la majorité des cas les mutations retrouvées s'expriment à l'état hétérozygote. Dans ce cas, la mutation/activation de ALK semble jouer un rôle crucial dans l'agressivité et la progression tumorale.

Afin de mieux comprendre le rôle de phospho-ALK dans la progression de la maladie et évaluer si cette protéine représente une cible thérapeutique potentielle, elle a été inhibée dans des xénogreffes établies de neuroblastome exprimant différents statuts de ALK. Nos données et celles d'un autre groupe (Bresler et al., 2011) révèlent que seules les xénogreffes portant la mutation R1275Q ou une amplification de ALK sont sensibles aux inhibiteurs spécifiques de ALK, alors que les xénogreffes portant la mutation F1174L ou un ALK sauvage (retrouvé le plus fréquemment chez les patients) y sont résistantes. Ainsi l'inhibition de phospho-ALK est efficace uniquement pour une faible proportion de patients (environ 6% des patients, ceux portant la mutation R1275Q ou une amplification de ALK). De plus, cette proportion englobe des patients présentant une tumeur associée à un pronostic favorable ne nécessitant pas forcément d'intervention thérapeutique mais uniquement une surveillance.

A l'heure actuelle, la raison pour laquelle les inhibiteurs de phospho-ALK ne sont pas actifs sur certaines mutations n'est pas clairement définie.

D'après la structure tridimensionnelle du récepteur ALK (Bossi et al., 2010), la substitution de certains résidus pourrait induire des modifications de configuration du domaine tyrosine kinase du récepteur. En particulier, la mutation F1174L induirait une affinité plus grande du récepteur pour l'ATP, réduisant ainsi la fixation ATP-dépendante de l'inhibiteur dans la poche ATP de la tyrosine kinase de ALK (Bresler et al., 2011).

D'autres mécanismes de résistance revus par (Lovly and Pao, 2012) ont été proposés. L'apparition d'altérations génétiques supplémentaires dans le gène cible a été décrite. Notamment, des amplifications, des réarrangements chromosomiques ou des mutations de ALK pourraient survenir au cours du traitement (Doebele et al., 2012). De façon intéressante, l'apparition de la mutation F1174L (deuxième mutation la plus fréquente du neuroblastome, résistante au crizotinib) a été rapportée dans des tumeurs devenues résistantes au crizotinib portant un réarrangement de ALK (Sasaki et al., 2010). D'autres études ont décrit l'existence de voie d'échappement par l'activation de récepteurs à tyrosine kinase alternatifs à ALK, notamment le récepteur du VEGF (*Vascular endothelial growth factor*). Dans ce cas, même si une inhibition majeure de phospho-ALK est obtenue après traitement par l'inhibiteur, l'activation de certaines voies de prolifération et de survie cellulaire, comme les voies AKT et MAPK seraient maintenues (Katayama et al., 2012). Les résultats que nous avons obtenus dans l'article 1 après traitement de la xéno greffe IGR-N835 (ALK, F1174L) par le TAE684 suggèrent ce type de mécanisme d'échappement. En effet, nous obtenons une inhibition majeure de la phosphorylation de ALK mais une absence d'inhibition des voies sous-jacentes associée à une absence d'efficacité du traitement. Il serait donc très intéressant d'évaluer l'activation de la voie VEGFR dans cette tumeur.

De façon concomitante et complémentaire aux travaux présentés dans la thèse, des études ont rapporté un rôle primordial du récepteur ALK en dehors des altérations génétiques dans la régulation de la prolifération cellulaire, dans l'oncogenèse et la progression tumorale du neuroblastome (Passoni et al., 2009 ; Schulte et al. 2010 ; Reiff et al., 2011), suggérant que la protéine ALK entière représente aussi une cible thérapeutique intéressante. Rappelons que l'activation de ALK est détectée dans 50% des tumeurs neuroblastiques (résultats de l'article 1) alors que des mutations activatrices du récepteur sont détectées dans 8% des cas environ. Ainsi il est clair que des mécanismes autres que des mutations de ALK sont impliqués dans l'activation de ALK dans une large majorité de cas et pourraient participer à l'oncogénèse et à la progression de ces neuroblastomes.

De nombreux mécanismes de régulation de ALK sont décrits et pourraient être ciblés pour développer des stratégies thérapeutiques complémentaires aux inhibiteurs de ALK.

La régulation de l'expression et de l'activation de ALK par son ligand MDK, le contrôle de la localisation cellulaire de ALK, son interaction avec d'autres protéines (incluant N-myc et PHOX2B (Schönherr et al., 2012 ; Bachetti et al., 2010) ou encore sa capacité à activer des



voies de signalisation variées apparaissent comme des événements clés intéressants à cibler dans une perspective thérapeutique. L'utilisation d'outils pharmacologiques variés comme des anticorps monoclonaux agonistes ou antagonistes de ALK, des siRNAs dirigés contre son ligand activateur MDK ou contre PHOX2B ou N-Myc a permis de mieux comprendre les mécanismes de régulation de ALK ; et ces outils représentent des modalités thérapeutiques intéressantes, complémentaires des inhibiteurs pharmacologiques de ALK.

De façon intéressante, nous avons prouvé dans deux lignées cellulaires (IMR-32 et LAN-1), qu'il était plus efficace d'induire l'inhibition de ALK par le biais d'un siRNA anti-MDK plutôt que de cibler directement la protéine ALK par un siRNA. Nous ne pouvons pas exclure que certains effets de MDK soient indépendants de ALK mais ces données révèlent un mécanisme de régulation de ALK original. Ces résultats vont dans le sens d'une étude démontrant que le récepteur ALK appartient à la famille des récepteurs à dépendance. Ainsi lorsqu'il n'est plus stimulé par un ligand, le récepteur est dégradé et peut induire la mort des cellules par apoptose (Mourali et al., 2006). Ainsi ALK ne semble pas toujours induire des signaux de prolifération ou de survie mais pourrait au contraire réguler la mort des cellules.

Des thérapies inhibant MDK pourraient ainsi être envisagées dans les tumeurs dont la croissance et la survie cellulaire semblent très dépendantes de la signalisation MDK-ALK, c'est-à-dire des tumeurs exprimant un niveau élevé de MDK et le récepteur ALK.

Au moment où les inhibiteurs de tyrosine kinase spécifiques de ALK ne sont efficaces que sur une faible proportion de patients, la proposition et l'évaluation de telles thérapies innovantes ou d'associations thérapeutiques ciblant la voie de signalisation ALK semble nécessaire. Une perspective intéressante serait d'adapter la stratégie thérapeutique en se basant sur la caractérisation de la signalisation de ALK dans les tumeurs. Particulièrement le statut de ALK, le niveau d'expression et de phosphorylation de ALK, le niveau d'expression de MDK et de ses récepteurs pourraient être analysés. Au vu des connaissances actuelles sur la voie ALK, il semble plus judicieux d'utiliser un inhibiteur pharmacologique de ALK en présence de mutations R1275Q ou d'une amplification de ALK. Les inhibiteurs de MDK pourraient être préconisés dans les tumeurs exprimant de forts taux de cette protéine et au moins un de ses récepteurs (ALK, LRP1 et SDC3). Enfin les travaux de Mazot et al. montrent que l'utilisation d'anticorps monoclonaux de ALK représente une approche thérapeutique intéressante basée sur la régulation du trafic intracellulaire de ALK (Mazot et al., 2011 et

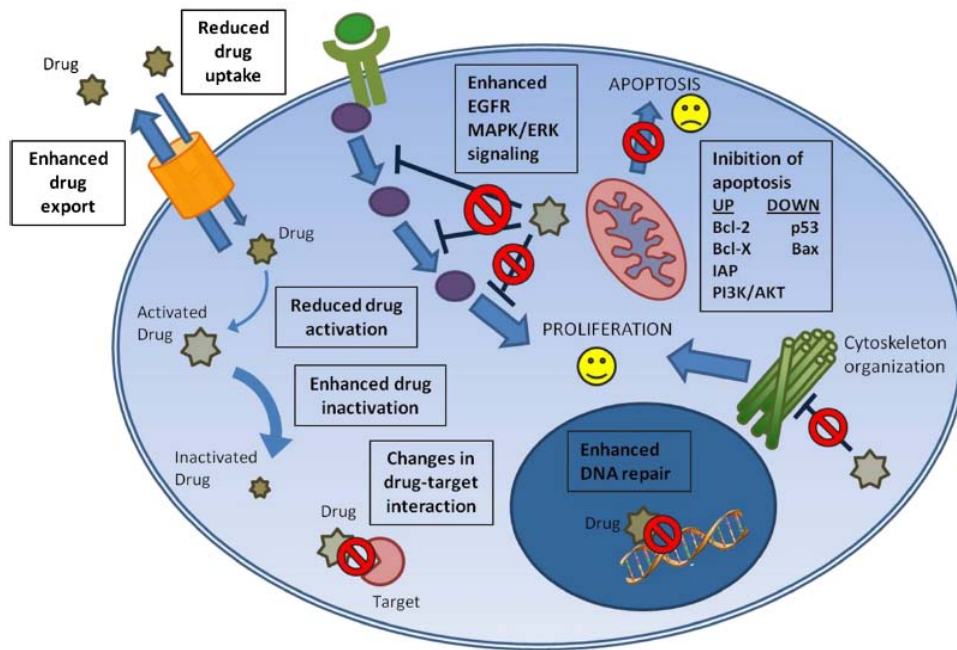
2012). Les tumeurs pour lesquelles la protéine ALK est retenue majoritairement au niveau intracellulaire (probablement les tumeurs portant la mutation F1174L) pourraient recevoir un traitement par un inhibiteur pharmacologique de ALK associé à un anticorps antagoniste de ALK, capable d'induire le recyclage de la protéine et d'augmenter la quantité de protéine accessible aux inhibiteurs en surface (Mazot et al., 2012). Il a également été démontré par les travaux de Carpenter et al., 2012 *in vitro*, que l'administration préalable de crizotinib améliore l'efficacité anti-tumorale d'anticorps antagonistes de ALK en induisant une accumulation de ALK à la surface des cellules.

D'autre part, l'étude de Tanizaki et al., 2012 a démontré le bénéfice antitumoral de l'association entre le TAE684 (inhibiteur de ALK) et le AZD6244 (inhibiteur des MAPK) dans le cancer du poumon *in vitro* et *in vivo*. D'autre part, l'inhibition simultanée de ALK et d'autres récepteurs à tyrosine kinase comme le VEGFR ou l'EGFR, décrits comme des voies d'échappement au crizotinib permettra probablement d'obtenir une meilleur efficacité thérapeutique (Yano et al., 2012).

Enfin d'autres inhibiteurs de ALK, qui pourraient notamment éviter les phénomènes de résistance sont actuellement en cours de développement préclinique (CH5424802 (Chugai Pharmaceuticals), ASP3026 (Astellas Pharma) et, CEP-28122 (Cephalon Inc.)).

Ces données montrent l'importance qui doit être accordée à la recherche des mécanismes de résistance et à la proposition d'associations thérapeutiques rationnelles. Le second axe de recherche représente une exploration plus directe des mécanismes de résistance au CPT-11 dans le modèle de résistance. L'approche mécanistique que nous avons menée a permis d'identifier des mécanismes associés à la résistance au CPT-11, qui sont différents et probablement complémentaires des mécanismes issus du premier axe de travail.

La recherche des mécanismes de chimiorésistance est laborieuse car il s'agit d'un phénomène multifactoriel. Pour survivre aux attaques que représentent les chimiothérapies, les cellules malignes doivent constamment s'adapter en intensifiant certaines de leurs fonctions physiologiques et/ou en développant de nouveaux mécanismes, illustrées par la figure 1. Il est primordial d'identifier les marqueurs fiables qui signent cette adaptation.



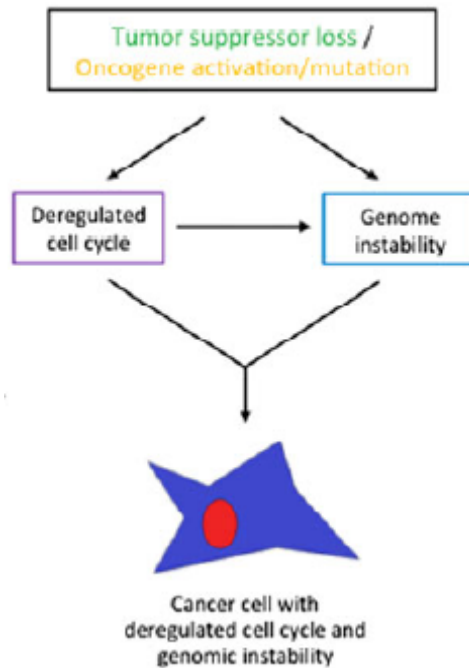
**Figure 1** - Représentation des principaux mécanismes de chimiorésistance allant du métabolisme des médicaments jusqu'aux voies régulant la survie et la mort des cellules (Fodale et al., 2011).

Après avoir exclu l'implication de mécanismes « classiquement » à l'origine de la résistance aux inhibiteurs de topoisomérase I, nous avons pu délimiter plus précisément le niveau cellulaire de nos recherches. Nous nous sommes orientés autour des événements propres au mécanisme d'action du CPT-11 dans le noyau et à la réponse cellulaire engendrée avant l'entrée en apoptose. De façon surprenante, nous avons constaté que le CPT-11 n'induit ni l'augmentation du nombre de complexes de clivage ni l'augmentation de la formation des dommages à l'ADN dont les niveaux sont déjà particulièrement élevés dans les tumeurs résistantes à l'état basal. De façon encore plus surprenante, alors que nous avons constaté cette accumulation basale importante de lésions sur l'ADN, la signalisation de ces dommages est altérée, en particulier les activations de la voie p53 et de H2AX sont absentes.

Le défaut d'activation d'H2AX joue certainement un rôle majeur dans l'acquisition d'une instabilité génétique dans les tumeurs résistantes. De façon remarquable, H2AX est situé en 11q23.3. La délétion de la région 11q est fréquente dans les neuroblastomes et associée à des tumeurs agressives de mauvais pronostic. Dans le modèle de résistance, nous savons que le défaut d'expression d'H2AX n'est pas lié à une perte chromosomique puisque le profil génomique de la portion 11q issu de la CGH-array est normal dans les tumeurs sensibles et dans les tumeurs résistantes (données non présentées). D'autre part, le niveau de régulation

post-traductionnelle de H2AX est très fin et complexe. Il implique différents processus comme des ubiquitynations ou différentes phosphorylations. En effet, de façon physiologique cette protéine est phosphorylée en position Y142. Lorsque l'ADN est endommagé par une cassure double-brin, ce résidu sera déphosphorylé par les phosphatases de la famille Eya au profit de la phosphorylation du résidu ser139 (que nous avons observée lors de nos travaux) (revu par Cook et al., 2009). Ceci représente un signal majeur permettant le recrutement des facteurs de réparation de l'ADN. Il serait intéressant d'évaluer la phosphorylation du résidu Y142 dans la tumeur résistante. La persistance de phosphorylation de ce résidu pourrait entraver la phosphorylation en position ser139 et ainsi entraîner un défaut de prise en charge des dommages de l'ADN dans les cellules résistantes.

L'administration répétée de CPT-11 dans les cellules résistantes présentant un défaut majeur de prise en charge des dommages induits par la drogue va causer l'accumulation massive de dommages et certainement l'acquisition d'une instabilité génétique accrue. Nous avons aussi constaté l'altération de la régulation du cycle cellulaire dans les tumeurs résistantes. Une connexion forte est décrite entre le contrôle du cycle cellulaire et l'instabilité génomique (Coschi and Dick, 2012). Ces auteurs proposent différents modèles reliant ces deux phénomènes. La figure 2 illustre un de ces modèles montrant que la sur-expression d'oncogènes ou la perte de suppresseurs de tumeur clé (comme p53) peut conduire à l'instabilité génomique et à la dérégulation du cycle cellulaire. Ceci va favoriser l'acquisition de dommages supplémentaires et ainsi renforcer le pouvoir tumorigène des cellules.



**Figure 2-** Représentation de la connexion entre instabilité génomique et dérégulation du cycle cellulaire (Coschi and Dick, 2012).

Au total, nous avons démontré que l'acquisition de la résistance est associée à un grand nombre d'événements dans les tumeurs résistantes, principalement la dérégulation d'expression d'une voie de signalisation formée par deux ligands (PTN et MDK) et un récepteur de surface (ALK) (dans l'axe 1) ainsi qu'une réponse altérée aux dommages à l'ADN (dans l'axe 2). Nous ne savons pas si ces phénomènes sont reliés mais il est connu que la chimiorésistance peut être causée par plusieurs mécanismes survenant dans des compartiments cellulaires différents.

Dans les tumeurs résistantes, nous avons observé une altération de la fonction p53, inducteur clé de l'apoptose et la sur-expression du récepteur membranaire ALK, capable de stimuler des voies de survie cellulaire comme PI3K/AKT. Alors que le déclenchement de la mort cellulaire dépend de la balance entre signaux pro- et anti-apoptotiques, nous montrons qu'à différents niveaux cellulaires, des altérations perturbent cet équilibre en faveur du maintien de la survie cellulaire dans le modèle IGR-NB8-R.

D'autre part, l'activation de la voie PI3K/AKT est associée à un mauvais pronostic des patients atteints de neuroblastome (Opel et al., 2007). Cette voie est associée à la

chimiorésistance (Sartelet et al., 2012) et de nombreuses études ont corrélé l'effet cytotoxique d'un nombre important d'agents chimiothérapeutiques à leur capacité à inhiber cette voie. D'après les résultats de l'article 1 (Figure 5), nous avons observé que cette voie est activée dans les tumeurs IGR-NB8-R. Après administration de TAE684, celle-ci reste active et ceci est associé à une inefficacité de la drogue. En revanche, nous pouvons associer l'efficacité du TAE684 à l'inhibition de P-AKT, dans la lignée CLB-GA (Figure 5 de l'article 1). Les mécanismes par lesquels AKT va induire un phénotype résistant ne sont pas encore totalement élucidés mais il a été proposé que cette protéine pourrait stimuler la réparation de l'ADN. De façon tout à fait intéressante, une étude a montré que la MDK serait un médiateur extracellulaire du rôle anti-apoptotique de AKT associé la chimiorésistance (Mirkin et al., 2005). Ainsi, une des perspectives de nos travaux (notamment ceux de l'article 2) est d'associer le CPT-11 à des inhibiteurs de MDK en particulier dans le modèle résistant IGR-NB8-R. Il sera intéressant d'évaluer l'efficacité de cette association à la fois sur la réponse au CPT-11 et sur la formation et la signalisation des dommages à l'ADN.

D'autres travaux ont montré que la signalisation induite par des récepteurs à activité tyrosine kinase (incluant le récepteur chimérique de fusion NPM-ALK) pourrait augmenter la formation de dommages à l'ADN après traitement par des agents cytotoxiques (Hoser et al., 2003). Ces dommages représenteraient en fait des intermédiaires de réparation de l'ADN. Ainsi, une réparation de l'ADN plus efficace serait responsable d'une meilleure survie des cellules exprimant un récepteur à tyrosine kinase activé après traitement par un cytotoxique. Dans les tumeurs résistantes nous avons mesuré un niveau plus élevé de dommages à l'ADN. En revanche, nous ne savons pas si ce niveau d'endommagement est régulé par la présence du récepteur ALK et/ou son activation. Même si celui-ci est sur-exprimé dans les tumeurs résistantes, nous n'avons pas réussi à détecter son activation. De plus, lorsque nous avons combiné le CPT-11 au TAE684 dans les tumeurs IGR-NB8-R, nous n'avons pas obtenu une meilleure efficacité du CPT-11 (Supplemental figure 5, annexes). Malheureusement, l'utilisation du TAE684 en traitement seul n'avait pas montré d'efficacité dans cette tumeur (Supplemental figure 5, annexes). Nous avons donc combiné le TAE684 et le CPT-11 dans le modèle CLB-GA, présentant une sensibilité au TAE684. (Supplemental figure 5, annexes). Dans cette tumeur, la combinaison du CPT-11 et du TAE684 a montré un effet additif. (Supplemental figure 5, annexes). Il reste donc délicat de confirmer ou d'infirmer le rôle direct de ALK et de la voie de signalisation associée à ce récepteur dans la réponse aux cytotoxiques

et encore plus dans l'acquisition ou le maintien de la résistance à l'irinotecan, en lien avec les perturbations de prise en charge des dommages à l'ADN décrites dans notre modèle de résistance.

En conclusion, nous avons mis en évidence que la voie de signalisation ALK-PTN-MDK et particulièrement l'axe MDK-ALK jouait un rôle majeur dans la viabilité des cellules de neuroblastome. De façon intéressante, au cours de l'acquisition de la résistance au CPT-11, PTN est sous-exprimée, l'expression de MDK reste élevée et leur récepteur commun, ALK est sur-exprimé (Table 1). En revanche, ALK n'est pas activé et n'a pas subi d'altérations géniques (mutation ou amplification) dans les tumeurs résistantes (Table 1). Ainsi la signalisation de MDK via le récepteur ALK sauvage pourrait être exacerbée dans les tumeurs résistantes et leur conférer un avantage de croissance et d'agressivité. Cette dérégulation ne permet certainement pas d'expliquer la totalité de la résistance mais s'ajoute aux anomalies détectées concernant la formation et la prise en charge des dommages à l'ADN.

# BIBLIOGRAPHIE

- Abel, F., R.M. Sjöberg, S. Nilsson, P. Kogner, and T. Martinsson. 2005. Imbalance of the mitochondrial pro- and anti-apoptotic mediators in neuroblastoma tumours with unfavourable biology. *Eur J Cancer*. 41:635–46.
- Allen, J.D., R.F. Brinkhuis, J. Wijnholds, and A.H. Schinkel. 1999. The mouse *Bcrp1/Mxr/Abcp* gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer research*. 59:4237–41.
- Alsner, J., J.Q. Svejstrup, E. Kjeldsen, B.S. Sorensen, and O. Westergaard. 1992. Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for in vivo function. *The Journal of biological chemistry*. 267:12408–11.
- Ambros, P.F., I.M. Ambros, G.M. Brodeur, M. Haber, J. Khan, A. Nakagawara, G. Schleiermacher, F. Speleman, R. Spitz, W.B. London, S.L. Cohn, A.D. Pearson, and J.M. Maris. 2009. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *British journal of cancer*. 100:1471–82.
- Arakawa, Y., S. Saito, H. Yamada, and K. Aiba. 2009. Simultaneous treatment with camptothecin and valproic acid suppresses induction of Bcl-X(L) and promotes apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis*. 14:1076–85.
- van Ark-Otte, J., M.A. Kedde, W.J. van der Vijgh, A.M. Dingemans, W.J. Jansen, H.M. Pinedo, E. Boven, and G. Giaccone. 1998. Determinants of CPT-11 and SN-38 activities in human lung cancer cells. *British journal of cancer*. 77:2171–6.
- Asgharzadeh, S., R. Pique-Regi, R. Sposto, H. Wang, Y. Yang, H. Shimada, K. Matthay, J. Buckley, A. Ortega, and R.C. Seeger. 2006. Prognostic significance of gene expression profiles of metastatic neuroblastomas lacking MYCN gene amplification. *Journal of the National Cancer Institute*. 98:1193–203.
- Attiyeh, E.F., W.B. London, Y.P. Mosse, Q. Wang, C. Winter, D. Khazi, P.W. McGrady, R.C. Seeger, A.T. Look, H. Shimada, G.M. Brodeur, S.L. Cohn, K.K. Matthay, and J.M. Maris. 2005. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *The New England journal of medicine*. 353:2243–53.
- Bachetti, T., D. Di Paolo, S. Di Lascio, V. Mirisola, C. Brignole, M. Bellotti, I. Caffa, C. Ferraris, M. Fiore, D. Fornasari, R. Chiarle, S. Borghini, U. Pfeffer, M. Ponzoni, I. Ceccherini, and P. Perri. 2010. PHOX2B-mediated regulation of ALK expression: in vitro identification of a functional relationship between two genes involved in neuroblastoma. *PLoS ONE*. 5.
- Bagatell, R., M. Beck-Popovic, W.B. London, Y. Zhang, A.D. Pearson, K.K. Matthay, T. Monclair, P.F. Ambros, and S.L. Cohn. 2009. 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., W.B. London, L.M. Wagner, S.D. Voss, C.F. Stewart, J.M. Maris, C. Kretschmar, and S.L. Cohn. 2011. Phase II study of irinotecan and temozolomide in children with relapsed or refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* 29:208–213.
- Bähr, C., and B. Groner. 2005. The IGF-1 receptor and its contributions to metastatic tumor growth—novel approaches to the inhibition of IGF-1R function. *Growth Factors.* 23:1–14.
- Balasubramanian, S., J. Ramos, W. Luo, M. Sirisawad, E. Verner, and J.J. Buggy. 2008. A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas. *Leukemia.* 22:1026–1034.
- Barker, E., B.M. Mueller, R. Handgretinger, M. Herter, A.L. Yu, and R.A. Reisfeld. 1991. Effect of a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody on cell-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer research.* 51:144–9.
- Barreca, A., E. Lasorsa, L. Riera, R. Machiorlatti, R. Piva, M. Ponzoni, I. Kwee, F. Bertoni, P.P. Piccaluga, S.A. Pileri, and G. Inghirami. 2011. Anaplastic lymphoma kinase in human cancer. *J. Mol. Endocrinol.* 47:R11–23.
- Barrows, L.R., J.A. Holden, M. Anderson, and P. D'Arpa. 1998. The CHO XRCC1 mutant, EM9, deficient in DNA ligase III activity, exhibits hypersensitivity to camptothecin independent of DNA replication. *Mutation research.* 408:103–10.
- Barthelmes, H.U., M. Habermeyer, M.O. Christensen, C. Mielke, H. Interthal, J.J. Pouliot, F. Boege, and D. Marko. 2004. TDP1 overexpression in human cells counteracts DNA damage mediated by topoisomerases I and II. *The Journal of biological chemistry.* 279:55618–25.
- Beckwith, J.B., and R.F. Martin. 1968. Observations on the histopathology of neuroblastomas. *Journal of pediatric surgery.* 3:106–10.
- Bergerat, A., D. Gabelle, and P. Forterre. 1994. Purification of a DNA topoisomerase II from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae*. A thermostable enzyme with both bacterial and eucaryal features. *The Journal of biological chemistry.* 269:27663–9.
- Bhattacharya, A., K. Toth, R. Mazurchuk, J.A. Sperryak, H.K. Slocum, L. Pendyala, R. Azrak, S. Cao, F.A. Durrani, and Y.M. Rustum. 2004. Lack of microvessels in well-differentiated regions of human head and neck squamous cell carcinoma A253 associated with functional magnetic resonance imaging detectable hypoxia, limited drug delivery, and resistance to irinotecan therapy. *Clin Cancer Res.* 10:8005–17.
- Bjornsti, M.A., P. Benedetti, G.A. Viglianti, and J.C. Wang. 1989. Expression of human DNA topoisomerase I in yeast cells lacking yeast DNA topoisomerase I: restoration of sensitivity of the cells to the antitumor drug camptothecin. *Cancer research.* 49:6318–23.
- ten Bokkel Huinink, W., J. Carmichael, D. Armstrong, A. Gordon, and J. Malfetano. 1997. Efficacy and safety of topotecan in the treatment of advanced ovarian carcinoma. *Seminars in oncology.* 24:S5–19–S5–25.

- Bonven, B.J., E. Gocke, and O. Westergaard. 1985. A high affinity topoisomerase I binding sequence is clustered at DNAase I hypersensitive sites in Tetrahymena R-chromatin. *Cell*. 41:541–51.
- Bordow, S.B., M. Haber, J. Madafiglio, B. Cheung, G.M. Marshall, and M.D. Norris. 1994. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene correlates with amplification and overexpression of the N-myc oncogene in childhood neuroblastoma. *Cancer research*. 54:5036–40.
- Bourdeaut, F., D. Trochet, I. Janoueix-Lerosey, A. Ribeiro, A. Deville, C. Coz, J.F. Michiels, S. Lyonnet, J. Amiel, and O. Delattre. 2005. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Cancer letters*. 228:51–8.
- Brangi, M., T. Litman, M. Ciotti, K. Nishiyama, G. Kohlhagen, C. Takimoto, R. Robey, Y. Pommier, T. Fojo, and S.E. Bates. 1999. Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantrone-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells. *Cancer research*. 59:5938–46.
- Bresler, S.C., A.C. Wood, E.A. Haglund, J. Courtright, L.T. Belcastro, J.S. Plegaria, K. Cole, Y. Toporovskaya, H. Zhao, E.L. Carpenter, J.G. Christensen, J.M. Maris, M.A. Lemmon, and Y.P. Mossé. 2011. Differential inhibitor sensitivity of anaplastic lymphoma kinase variants found in neuroblastoma. *Sci Transl Med*. 3:108ra114.
- Brodeur, G.M., J.M. Maris, D.J. Yamashiro, M.D. Hogarty, and P.S. White. 1997. Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol*. 19:93–101
- Brodeur, G.M. 2003. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature reviews*. 3:203–16.
- Burgess, D.J., J. Doles, L. Zender, W. Xue, B. Ma, W.R. McCombie, G.J. Hannon, S.W. Lowe, and M.T. Hemann. 2008. Topoisomerase levels determine chemotherapy response in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:9053–8.
- Burke, T.G., and Z. Mi. 1994. The structural basis of camptothecin interactions with human serum albumin: impact on drug stability. *Journal of medicinal chemistry*. 37:40–6.
- Calvet, L., A. Santos, A. Valent, M.-J. Terrier-Lacombe, P. Opolon, J.-L. Merlin, G. Aubert, J. Morizet, J.H.M. Schellens, J. Bénard, and G. Vassal. 2004. No topoisomerase I alteration in a neuroblastoma model with in vivo acquired resistance to irinotecan. *Br. J. Cancer*. 91:1205–1212.
- Calvet, L., B. Georger, M. Regairaz, P. Opolon, L. Machet, J. Morizet, J.-M. Joseph, N. Elie, and G. Vassal. 2006. Pleiotrophin, a candidate gene for poor tumor vasculature and in vivo neuroblastoma sensitivity to irinotecan. *Oncogene*. 25:3150–3159.
- Cao, Y., Z.X. Jin, X.P. Tong, S. Yue, T. Sakai, T. Kawanami, T. Sawaki, M. Miki, H. Iwao, A. Nakajima, Y. Masaki, Y. Fukushima, Y. Fujita, H. Nakajima, T. Okazaki, and H. Umehara. 2010. Synergistic effects of topoisomerase I inhibitor, SN38, on Fas-mediated apoptosis. *Anticancer research*. 30:3911–7.

Capasso, M., M. Devoto, C. Hou, S. Asgharzadeh, J.T. Glessner, E.F. Attiyeh, Y.P. Mosse, C. Kim, S.J. Diskin, K.A. Cole, K. Bosse, M. Diamond, M. Laudenslager, C. Winter, J.P. Bradfield, R.H. Scott, J. Jagannathan, M. Garris, C. McConville, W.B. London, R.C. Seeger, S.F. Grant, H. Li, N. Rahman, E. Rappaport, H. Hakonarson, and J.M. Maris. 2009. Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma. *Nature genetics*. 41:718–23.

Carlsen, N.L. 1990. How frequent is spontaneous remission of neuroblastomas? Implications for screening. *British journal of cancer*. 61:441–6.

Carol, H., I. Boehm, C.P. Reynolds, M.H. Kang, J.M. Maris, C.L. Morton, R. Gorlick, E.A. Kolb, S.T. Keir, J. Wu, A.E. Wozniak, Y. Yang, M. Manfredi, J. Ecsedy, J. Wang, G. Neale, P.J. Houghton, M.A. Smith, and R.B. Lock. 2011. Efficacy and pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of the Aurora kinase A inhibitor MLN8237 against preclinical models of pediatric cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68:1291–1304.

Carpenter, E.L., E.A. Haglund, E.M. Mace, D. Deng, D. Martinez, A.C. Wood, A.K. Chow, D.A. Weiser, L.T. Belcastro, C. Winter, S.C. Bresler, S. Asgharzadeh, R.C. Seeger, H. Zhao, R. Guo, J.G. Christensen, J.S. Orange, B.R. Pawel, M.A. Lemmon, and Y.P. Mossé. 2012. Antibody targeting of anaplastic lymphoma kinase induces cytotoxicity of human neuroblastoma. *Oncogene*.

Castano, I.B., P.M. Brzoska, B.U. Sadoff, H. Chen, and M.F. Christman. 1996. Mitotic chromosome condensation in the rDNA requires TRF4 and DNA topoisomerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development*. 10:2564–76.

Champoux, J.J., and R. Dulbecco. 1972. An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA—a possible swivel for DNA replication (polyoma-ethidium bromide-mouse-embryo cells-dye binding assay). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69:143–146.

Champoux, J.J. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual review of biochemistry*. 70:369–413.

Chatterjee, S., M.F. Cheng, D. Trivedi, S.J. Petzold, and N.A. Berger. 1989. Camptothecin hypersensitivity in poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Cancer communications*. 1:389–94.

Chen, Y., J. Takita, Y.L. Choi, M. Kato, M. Ohira, M. Sanada, L. Wang, M. Soda, A. Kikuchi, T. Igarashi, A. Nakagawara, Y. Hayashi, H. Mano, and S. Ogawa. 2008. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*. 455:971–4.

Chrencik, J.E., B.L. Staker, A.B. Burgin, P. Pourquier, Y. Pommier, L. Stewart, and M.R. Redinbo. 2004. Mechanisms of camptothecin resistance by human topoisomerase I mutations. *Journal of molecular biology*. 339:773–84.

Christensen, J.G., H.Y. Zou, M.E. Arango, Q. Li, J.H. Lee, S.R. McDonnell, S. Yamazaki, G.R. Alton, B. Mroczkowski, and G. Los. 2007. Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol. Cancer Ther.* 6:3314–3322.

- Cinelli, M.A., B. Cordero, T.S. Dexheimer, Y. Pommier, and M. Cushman. 2009. Synthesis and biological evaluation of 14-(aminoalkyl-aminomethyl)aromathecins as topoisomerase I inhibitors: investigating the hypothesis of shared structure-activity relationships. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 17:7145–55.
- Ciotti, M., N. Basu, M. Brangi, and I.S. Owens. 1999. Glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by the human UDP-glucuronosyltransferases encoded at the UGT1 locus. *Biochemical and biophysical research communications*. 260:199–202.
- Cohn, S.L., A.D. Pearson, W.B. London, T. Monclair, P.F. Ambros, G.M. Brodeur, A. Faldum, B. Hero, T. Iehara, D. Machin, V. Mosseri, T. Simon, A. Garaventa, V. Castel, and K.K. Matthay. 2009. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. 27:289–97.
- Cole, S.P., and R.G. Deeley. 1993. Multidrug resistance-associated protein: sequence correction. *Science (New York, N.Y.)*. 260:879.
- Connelly, J.C., and D.R. Leach. 2004. Repair of DNA covalently linked to protein. *Molecular cell*. 13:307–16.
- Corbett, K.D., and J.M. Berger. 2004. Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. 33:95–118.
- Cook, P.J., B.G. Ju, F. Telese, X. Wang, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld. 2009. Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature*. 458:591–596.
- Coschi, C.H., and F.A. Dick. 2012. Chromosome instability and deregulated proliferation: an unavoidable duo. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*.
- Coulter, D.W., J. Blatt, A.J. D’Ercole, and B.M. Moats-Staats. 2008. IGF-I receptor inhibition combined with rapamycin or temsirolimus inhibits neuroblastoma cell growth. *Anticancer Res*. 28:1509–1516.
- Crea, F., E. Giovannetti, F. Cortesi, V. Mey, S. Nannizzi, M.I. Gallegos Ruiz, S. Ricciardi, M. Del Tacca, G.J. Peters, and R. Danesi. 2009. Epigenetic mechanisms of irinotecan sensitivity in colorectal cancer cell lines. *Molecular cancer therapeutics*. 8:1964–73.
- Csermely, P., V. Agoston, and S. Pongor. 2005. The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design. *Trends Pharmacol. Sci*. 26:178–182.
- Cusack, J.C., R. Liu, and A.S. Baldwin. 2000. Inducible chemoresistance to 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]-carbonyloxycamptothecin (CPT-11) in colorectal cancer cells and a xenograft model is overcome by inhibition of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer research*. 60:2323–30.
- D’Andon et al.,. 2004. LE NEUROBLASTOME.

- D'Angio, G.J., A.E. Evans, and C.E. Koop. 1971. Special pattern of widespread neuroblastoma with a favourable prognosis. *Lancet*. 1:1046–9.
- D'Onofrio, G., F. Tramontano, A.S. Dorio, A. Muzi, V. Maselli, D. Fulgione, G. Graziani, M. Malanga, and P. Quesada. 2011 Poly(ADP-ribose) polymerase signaling of topoisomerase I-dependent DNA damage in carcinoma cells. *Biochemical pharmacology*. 81:194–202.
- Davies, S.L., P.S. North, A. Dart, N.D. Lakin, and I.D. Hickson. 2004. Phosphorylation of the Bloom's syndrome helicase and its role in recovery from S-phase arrest. *Molecular and cellular biology*. 24:1279–91.
- De Bernardi, B., M. Carli, F. Casale, P. Corciulo, L. Cordero di Montezemolo, C. De Laurentis, S. Bagnulo, M. Brisigotti, N. Marchese, A. Garaventa, and et al. 1992. Standard-dose and high-dose peptichemio and cisplatin in children with disseminated poor-risk neuroblastoma: two studies by the Italian Cooperative Group for Neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 10:1870–8.
- De Brouwer, S., K. De Preter, C. Kumps, P. Zabrocki, M. Porcu, E.M. Westerhout, A. Lakeman, J. Vandesompele, J. Hoebbeck, T. Van Maerken, A. De Paepe, G. Laureys, J.H. Schulte, A. Schramm, C. Van Den Broecke, J. Vermeulen, N. Van Roy, K. Beiske, M. Renard, R. Noguera, O. Delattre, I. Janoueix-Lerosey, P. Kogner, T. Martinsson, A. Nakagawara, M. Ohira, H. Caron, A. Eggert, J. Cools, R. Versteeg, and F. Speleman. 2010. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin. Cancer Res*. 16:4353–4362.
- Debethune, L., G. Kohlhagen, A. Grandas, and Y. Pommier. 2002. Processing of nucleopeptides mimicking the topoisomerase I-DNA covalent complex by tyrosyl-DNA phosphodiesterase. *Nucleic acids research*. 30:1198–204.
- Deng, C., J.A. Brown, D. You, and J.M. Brown. 2005. Multiple endonucleases function to repair covalent topoisomerase I complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 170:591–600.
- Desai, S.D., L.F. Liu, D. Vazquez-Abad, and P. D'Arpa. 1997. Ubiquitin-dependent destruction of topoisomerase I is stimulated by the antitumor drug camptothecin. *The Journal of biological chemistry*. 272:24159–64.
- Desai, S.D., T.K. Li, A. Rodriguez-Bauman, E.H. Rubin, and L.F. Liu. 2001. Ubiquitin/26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase I as a resistance mechanism to camptothecin in tumor cells. *Cancer research*. 61:5926–32.
- Desai, S.D., H. Zhang, A. Rodriguez-Bauman, J.M. Yang, X. Wu, M.K. Gounder, E.H. Rubin, and L.F. Liu. 2003. Transcription-dependent degradation of topoisomerase I-DNA covalent complexes. *Molecular and cellular biology*. 23:2341–50.
- Di Paolo, D., C. Ambrogio, F. Pastorino, C. Brignole, C. Martinengo, R. Carosio, M. Loi, G. Pagnan, L. Emionite, M. Cilli, D. Ribatti, T.M. Allen, R. Chiarle, M. Ponzoni, and P. Perri. 2011. Selective therapeutic targeting of the anaplastic lymphoma kinase with liposomal siRNA induces apoptosis and inhibits angiogenesis in neuroblastoma. *Mol. Ther*. 19:2201–2212.

- Doebele, R.C., A.B. Pilling, D.L. Aisner, T.G. Kutateladze, A.T. Le, A.J. Weickhardt, K.L. Kondo, D.J. Linderman, L.E. Heasley, W.A. Franklin, M. Varella-Garcia, and D.R. Camidge. 2012. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 18:1472–1482.
- Douc-Rasy, S., D. Goldschneider, K. Million, and J. Benard. 2004. [Interrelations between p73 and p53: a model, neuroblastoma]. *Med Sci (Paris)*. 20:317–24.
- Duyster, J., R.Y. Bai, and S.W. Morris. 2001. Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (ALK). *Oncogene*. 20:5623–37.
- El-Badry, O.M., J.A. Romanus, L.J. Helman, M.J. Cooper, M.M. Rechler, and M.A. Israel. 1989. Autonomous growth of a human neuroblastoma cell line is mediated by insulin-like growth factor II. *J. Clin. Invest.* 84:829–839.
- Engelman, J.A. 2009. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat. Rev. Cancer*. 9:550–562.
- Esiashvili, N., C. Anderson, and H.M. Katzenstein. 2009. Neuroblastoma. *Current problems in cancer*. 33:333–60.
- Espinoza-Fonseca, L.M. 2006. The benefits of the multi-target approach in drug design and discovery. *Bioorg. Med. Chem.* 14:896–897.
- Evans, A.E., G.J. D'Angio, and C.E. Koop. 1976. Diagnosis and treatment of neuroblastoma. *Pediatric clinics of North America*. 23:161–70.
- Evans, A.E., K.D. Kisselbach, X. Liu, A. Eggert, N. Ikegaki, A.M. Camoratto, C. Dionne, and G.M. Brodeur. 2001. Effect of CEP-751 (KT-6587) on neuroblastoma xenografts expressing TrkB. *Med. Pediatr. Oncol.* 36:181–184.
- Fairfield, F.R., W.R. Bauer, and M.V. Simpson. 1979. Mitochondria contain a distinct DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 254:9352–9354.
- Faisal, A., L. Vaughan, V. Bavetsias, C. Sun, B. Atrash, S. Avery, Y. Jamin, S.P. Robinson, P. Workman, J. Blagg, F.I. Raynaud, S.A. Eccles, L. Chesler, and S. Linardopoulos. 2011. The aurora kinase inhibitor CCT137690 downregulates MYCN and sensitizes MYCN-amplified neuroblastoma in vivo. *Mol. Cancer Ther.* 10:2115–2123.
- Fodale, V., M. Pierobon, L. Liotta, and E. Petricoin. 2011. Mechanism of cell adaptation: when and how do cancer cells develop chemoresistance? *Cancer J.* 17:89–95.
- Foulkes, W.D., P.N. Buu, D. Filiatrault, J.M. Leclerc, and S.A. Narod. 1997. Excess of congenital abnormalities in French-Canadian children with neuroblastoma: a case series study from Montreal. *Medical and pediatric oncology*. 29:272–9.
- Fujimori, A., Y. Hoki, N.C. Popescu, and Y. Pommier. 1996. Silencing and selective methylation of the normal topoisomerase I gene in camptothecin-resistant CEM/C2 human leukemia cells. *Oncology research*. 8:295–301.

- Fulda, S., and K.M. Debatin. 2003. Apoptosis pathways in neuroblastoma therapy. *Cancer letters*. 197:131–5.
- Fulda, S. 2009. The PI3K/Akt/mTOR pathway as therapeutic target in neuroblastoma. *Curr Cancer Drug Targets*. 9:729–737.
- Furuta, T., H. Takemura, Z.Y. Liao, G.J. Aune, C. Redon, O.A. Sedelnikova, D.R. Pilch, E.P. Rogakou, A. Celeste, H.T. Chen, A. Nussenzweig, M.I. Aladjem, W.M. Bonner, and Y. Pommier. 2003. Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *The Journal of biological chemistry*. 278:20303–12.
- Gammill, L.S., and M. Bronner-Fraser. 2003. Neural crest specification: migrating into genomics. *Nature reviews*. 4:795–805.
- Gellert, M., K. Mizuuchi, M.H. O’Dea, and H.A. Nash. 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 73:3872–6.
- Gellert, M. 1981. DNA topoisomerases. *Annual review of biochemistry*. 50:879–910.
- George, R.E., S.E. Lipshultz, S.R. Lipsitz, S.D. Colan, and L. Diller. 2004. Association between congenital cardiovascular malformations and neuroblastoma. *The Journal of pediatrics*. 144:444–8.
- George, R.E., T. Sanda, M. Hanna, S. Frohling, W. Luther, J. Zhang, Y. Ahn, W. Zhou, W.B. London, P. McGrady, L. Xue, S. Zozulya, V.E. Gregor, T.R. Webb, N.S. Gray, D.G. Gilliland, L. Diller, H. Greulich, S.W. Morris, M. Meyerson, and A.T. Look. 2008. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature*. 455:975–8.
- George, R.E., L. Diller, and M.L. Bernstein. 2010. Pharmacotherapy of neuroblastoma. *Expert Opin Pharmacother*. 11:1467–1478.
- Gilman, A.L., M.F. Ozkaynak, K.K. Matthay, M. Krailo, A.L. Yu, J. Gan, A. Sternberg, J.A. Hank, R. Seeger, G.H. Reaman, and P.M. Sondel. 2009. Phase I study of ch14.18 with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 in children with neuroblastoma after autologous bone marrow transplantation or stem-cell rescue: a report from the Children’s Oncology Group. *J Clin Oncol*. 27:85–91.
- Goldsmith, K.C., and M.D. Hogarty. 2005. Targeting programmed cell death pathways with experimental therapeutics: opportunities in high-risk neuroblastoma. *Cancer letters*. 228:133–41.
- Goldwasser, F., I. Bae, M. Valenti, K. Torres, and Y. Pommier. 1995. Topoisomerase I-related parameters and camptothecin activity in the colon carcinoma cell lines from the National Cancer Institute anticancer screen. *Cancer research*. 55:2116–21.
- Goldwasser, F., T. Shimizu, J. Jackman, Y. Hoki, P.M. O’Connor, K.W. Kohn, and Y. Pommier. 1996. Correlations between S and G2 arrest and the cytotoxicity of camptothecin in human colon carcinoma cells. *Cancer research*. 56:4430–7.

- van Golen, C.M., T.S. Schwab, B. Kim, M.E. Soules, S. Su Oh, K. Fung, K.L. van Golen, and E.L. Feldman. 2006. Insulin-like growth factor-I receptor expression regulates neuroblastoma metastasis to bone. *Cancer Res.* 66:6570–6578.
- Gottesman, M.M., and S.V. Ambudkar. 2001. Overview: ABC transporters and human disease. *Journal of bioenergetics and biomembranes.* 33:453–8.
- Grande, E., M.-V. Bolós, and E. Arriola. 2011. Targeting oncogenic ALK: a promising strategy for cancer treatment. *Mol. Cancer Ther.* 10:569–579.
- Grzelinski, M., N. Bader, F. Czubyko, and A. Aigner. 2005. Ribozyme-targeting reveals the rate-limiting role of pleiotrophin in glioblastoma. *Int. J. Cancer.* 117:942–951.
- Guo, C., P.S. White, M.J. Weiss, M.D. Hogarty, P.M. Thompson, D.O. Stram, R. Gerbing, K.K. Matthay, R.C. Seeger, G.M. Brodeur, and J.M. Maris. 1999. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene.* 18:4948–57.
- Haber, J.E. 2006. Chromosome breakage and repair. *Genetics.* 173:1181–5.
- Hanioka, N., H. Jinno, T. Tanaka-Kagawa, T. Nishimura, and M. Ando. 2001. Determination of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 activity in human and rat liver microsomes by HPLC with UV detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.* 25:65–75.
- Hank, J.A., R.R. Robinson, J. Surfus, B.M. Mueller, R.A. Reisfeld, N.K. Cheung, and P.M. Sondel. 1990. Augmentation of antibody dependent cell mediated cytotoxicity following in vivo therapy with recombinant interleukin 2. *Cancer research.* 50:5234–9.
- Harris, M.L., and C.A. Erickson. 2007. Lineage specification in neural crest cell pathfinding. *Dev Dyn.* 236:1–19.
- Hartmann, O., J. Lumbroso, J. Lemerle, M. Schlumberger, M. Ricard, B. Aubert, S. Coonaert, L. Merline, D. Olive, L. De Lumley, and et al. 1987. Therapeutic use of 131I-metaiodobenzylguanidine (MIBG) in neuroblastoma: a phase II study in nine patients. *Medical and pediatric oncology.* 15:205–11.
- Hertzberg, R.P., M.J. Caranfa, and S.M. Hecht. 1989. On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry.* 28:4629–38.
- Hipfner, D.R., R.G. Deeley, and S.P. Cole. 1999. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochimica et biophysica acta.* 1461:359–76.
- Hirota, T., N. Kunitoku, T. Sasayama, T. Marumoto, D. Zhang, M. Nitta, K. Hatakeyama, and H. Saya. 2003. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell.* 114:585–598.
- Ho, R., A. Eggert, T. Hishiki, J.E. Minturn, N. Ikegaki, P. Foster, A.M. Camoratto, A.E. Evans, and G.M. Brodeur. 2002. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res.* 62:6462–6466.



- Horie, K., A. Tomida, Y. Sugimoto, T. Yasugi, H. Yoshikawa, Y. Taketani, and T. Tsuruo. 2002. SUMO-1 conjugation to intact DNA topoisomerase I amplifies cleavable complex formation induced by camptothecin. *Oncogene*. 21:7913–22.
- Hoser, G., I. Majsterek, D.L. Romana, A. Slupianek, J. Blasiak, and T. Skorski. 2003. Fusion oncogenic tyrosine kinases alter DNA damage and repair after genotoxic treatment: role in drug resistance? *Leuk. Res.* 27:267–273.
- Houghton, P.J., P.J. Cheshire, J.D. Hallman, L. Lutz, H.S. Friedman, M.K. Danks, and J.A. Houghton. 1995. Efficacy of topoisomerase I inhibitors, topotecan and irinotecan, administered at low dose levels in protracted schedules to mice bearing xenografts of human tumors. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 36:393–403.
- Huang, T.T., S.M. Wuerzberger-Davis, B.J. Seufzer, S.D. Shumway, T. Kurama, D.A. Boothman, and S. Miyamoto. 2000. NF-kappaB activation by camptothecin. A linkage between nuclear DNA damage and cytoplasmic signaling events. *The Journal of biological Chemistry*. 275:9501–9.
- Huang, M., Z.H. Miao, H. Zhu, Y.J. Cai, W. Lu, and J. Ding. 2008. Chk1 and Chk2 are differentially involved in homologous recombination repair and cell cycle arrest in response to DNA double-strand breaks induced by camptothecins. *Molecular cancer therapeutics*. 7:1440–9.
- Huber, K., C. Kalcheim, and K. Unsicker. 2009. The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest. *Auton Neurosci*. 151:10–6.
- Hughes, M., H.B. Marsden, and M.K. Palmer. 1974. Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging. *Cancer*. 34:1706–11.
- Igney, F.H., and P.H. Krammer. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature reviews*. 2:277–88.
- Interthal, H., P.M. Quigley, W.G. Hol, and J.J. Champoux. 2004. The role of lysine 532 in the catalytic mechanism of human topoisomerase I. *The Journal of biological chemistry*. 279:2984–92.
- Islam, A., H. Kageyama, N. Takada, T. Kawamoto, H. Takayasu, E. Isogai, M. Ohira, K. Hashizume, H. Kobayashi, Y. Kaneko, and A. Nakagawara. 2000. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene*. 19:617–23.
- Jäger, R., K. Noll, K. Havemann, K.H. Pflüger, C. Knabbe, H. Rauvala, and G. Zugmaier. 1997. Differential expression and biological activity of the heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in lung cancer cell lines. *Int. J. Cancer*. 73:537–543.
- Janoueix-Lerosey, I., D. Lequin, L. Brugieres, A. Ribeiro, L. de Pontual, V. Combaret, V. Raynal, A. Puisieux, G. Schleiermacher, G. Pierron, D. Valteau-Couanet, T. Frebourg, J. Michon, S. Lyonnet, J. Amiel, and O. Delattre. 2008. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature*. 455:967–70.

- Janoueix-Lerosey, I., G. Schleiermacher, E. Michels, V. Mosseri, A. Ribeiro, D. Lequin, J. Vermeulen, J. Couturier, M. Peuchmaur, A. Valent, D. Plantaz, H. Rubie, D. Valteau-Couanet, C. Thomas, V. Combaret, R. Rousseau, A. Eggert, J. Michon, F. Speleman, and O. Delattre. 2009. Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 27:1026–33.
- Johnsen, J.I., P. Kogner, A. Albiñ, and M.A. Henriksson. 2009. Embryonal neural tumours and cell death. *Apoptosis.* 14:424–38.
- Johnson, K.J., S.E. Puumala, J.T. Soler, and L.G. Spector. 2008. Perinatal characteristics and risk of neuroblastoma. *International journal of cancer.* 123:1166–72.
- Juliano, R.L., and V. Ling. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et biophysica acta.* 455:152–62.
- Kadomatsu, K., and T. Muramatsu. 2004. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer letters.* 204:127–43.
- Kadomatsu, K. 2005. The midkine family in cancer, inflammation and neural development. *Nagoya J Med Sci.* 67:71–82.
- Kanagasabai, R., S. Liu, S. Salama, E.F. Yamasaki, L. Zhang, K.B. Greenchurch, and R.M. Snapka. 2009. Ubiquitin-family modifications of topoisomerase I in camptothecin-treated human breast cancer cells. *Biochemistry.* 48:3176–85.
- Kaneko, Y. 1987. Common karyotypic pattern in angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia (AILD) and malignant lymphoma of peripheral T-cell origin with AILD features. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi.* 50:1677–8.
- Katayama, R., A.T. Shaw, T.M. Khan, M. Mino-Kenudson, B.J. Solomon, B. Halmos, N.A. Jessop, J.C. Wain, A.T. Yeo, C. Benes, L. Drew, J.C. Saeh, K. Crosby, L.V. Sequist, A.J. Iafrate, and J.A. Engelman. 2012. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Sci Transl Med.* 4:120ra17.
- Kawabata, S., M. Oka, H. Soda, K. Shiozawa, K. Nakatomi, J. Tsurutani, Y. Nakamura, S. Doi, T. Kitazaki, K. Sugahara, Y. Yamada, S. Kamihira, and S. Kohno. 2003. Expression and functional analyses of breast cancer resistance protein in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 9:3052–7.
- Kawato, Y., M. Aonuma, Y. Hirota, H. Kuga, and K. Sato. 1991. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer research.* 51:4187–91.
- Keshelava, N., J.J. Zuo, P. Chen, S.N. Waidyaratne, M.C. Luna, C.J. Gomer, T.J. Triche, and C.P. Reynolds. 2001. Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer research.* 61:6185–93.
- Kim, E.S., S.Z. Soffer, J. Huang, K.W. McCrudden, A. Yokoi, C.A. Manley, W. Middlesworth, J.J. Kandel, and D.J. Yamashiro. 2002. Distinct response of experimental neuroblastoma to combination antiangiogenic strategies. *J. Pediatr. Surg.* 37:518–522.

- Knudson, A.G., Jr, and L.C. Strong. 1972. Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. *Am. J. Hum. Genet.* 24:514–532.
- Knuefermann, C., Y. Lu, B. Liu, W. Jin, K. Liang, L. Wu, M. Schmidt, G.B. Mills, J. Mendelsohn, and Z. Fan. 2003. HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene.* 22:3205–12.
- Konishi, N., M. Nakamura, S. Nakaoka, Y. Hiasa, M. Cho, H. Uemura, Y. Hirao, T. Muramatsu, and K. Kadomatsu. 1999. Immunohistochemical analysis of midkine expression in human prostate carcinoma. *Oncology.* 57:253–7.
- Koster, D.A., K. Palle, E.S.M. Bot, M.-A. Bjornsti, and N.H. Dekker. 2007. Antitumour drugs impede DNA uncoiling by topoisomerase I. *Nature.* 448:213–217.
- Kroep, J.R., and H. Gelderblom. 2009. Diflomotecan, a promising homocamptothecin for cancer therapy. *Expert opinion on investigational drugs.* 18:69–75.
- Kubota, N., F. Kanzawa, K. Nishio, Y. Takeda, T. Ohmori, Y. Fujiwara, Y. Terashima, and N. Saijo. 1992. Detection of topoisomerase I gene point mutation in CPT-11 resistant lung cancer cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188:571–577.
- Kumar, S., R.B. Mokhtari, R. Sheikh, B. Wu, L. Zhang, P. Xu, S. Man, I.D. Oliveira, H. Yeger, R.S. Kerbel, and S. Baruchel. 2011. Metronomic oral topotecan with pazopanib is an active antiangiogenic regimen in mouse models of aggressive pediatric solid tumor. *Clin. Cancer Res.* 17:5656–5667.
- Kushner, B.H., M.P. LaQuaglia, M.A. Bonilla, K. Lindsley, N. Rosenfield, S. Yeh, J. Eddy, W.L. Gerald, G. Heller, and N.K. Cheung. 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., K. Kramer, S. Modak, K. Yataghene, and N.-K.V. Cheung. 2011. High-dose cyclophosphamide-irinotecan-vincristine for primary refractory neuroblastoma. *Eur. J. Cancer.* 47:84–89.
- Kuss, B.J., M. Corbo, W.M. Lau, D.A. Fennell, N.M. Dean, and F.E. Cotter. 2002. In vitro and in vivo downregulation of MRP1 by antisense oligonucleotides: a potential role in neuroblastoma therapy. *International journal of cancer.* 98:128–33.
- Kwak, E.L., Y.-J. Bang, D.R. Camidge, A.T. Shaw, B. Solomon, R.G. Maki, S.-H.I. Ou, B.J. Dezube, P.A. Jänne, D.B. Costa, M. Varella-Garcia, W.-H. Kim, T.J. Lynch, P. Fidias, H. Stubbs, J.A. Engelman, L.V. Sequist, W. Tan, L. Gandhi, M. Mino-Kenudson, G.C. Wei, S.M. Shreeve, M.J. Ratain, J. Settleman, J.G. Christensen, D.A. Haber, K. Wilner, R. Salgia, G.I. Shapiro, J.W. Clark, and A.J. Iafrate. 2010. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 363:1693–1703.
- Ladanyi, M., G. Cavalchire, S.W. Morris, J. Downing, and D.A. Filippa. 1994. Reverse transcriptase polymerase chain reaction for the Ki-1 anaplastic large cell lymphoma-associated t(2;5) translocation in Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* 145:1296–1300.
- Lagadec, P., E. Griessinger, M.P. Nawrot, N. Fenouille, P. Colosetti, V. Imbert, M. Mari, P. Hofman, D. Czerucka, D. Rousseau, E. Berard, M. Dreano, and J.F. Peyron. 2008.

Pharmacological targeting of NF-kappaB potentiates the effect of the topoisomerase inhibitor CPT-11 on colon cancer cells. *British journal of cancer*. 98:335–44.

Lamant, L., K. Pulford, D. Bischof, S.W. Morris, D.Y. Mason, G. Delsol, and B. Mariamé. 2000. Expression of the ALK tyrosine kinase gene in neuroblastoma. *Am. J. Pathol.* 156:1711–1721.

Lansiaux, A., and C. Bailly. 2003. [A symphony for the camptothecins]. *Bulletin du cancer*. 90:239–45.

Lavergne, O., L. Lesueur-Ginot, F. Pla Rodas, P.G. Kasprzyk, J. Pommier, D. Demarquay, G. Prevost, G. Ulibarri, A. Rolland, A.M. Schiano-Liberatore, J. Harnett, D. Pons, J. Camara, and D.C. Bigg. 1998. Homocamptothecins: synthesis and antitumor activity of novel E-ring-modified camptothecin analogues. *Journal of medicinal chemistry*. 41:5410–9.

Lázcoz, P., J. Muñoz, M. Nistal, A. Pestaña, I. Encío, and J.S. Castresana. 2006. Frequent promoter hypermethylation of RASSF1A and CASP8 in neuroblastoma. *BMC Cancer*. 6:254.

Lebel, M., and P. Leder. 1998. A deletion within the murine Werner syndrome helicase induces sensitivity to inhibitors of topoisomerase and loss of cellular proliferative capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:13097–102.

Lei, X.Y., M. Zhong, L.F. Feng, B.Y. Zhu, S.S. Tang, and D.F. Liao. 2007. siRNA-mediated Bcl-2 and Bcl-xl gene silencing sensitizes human hepatoblastoma cells to chemotherapeutic drugs. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 34:450–6.

Leppard, J.B., and J.J. Champoux. 2005. Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma*. 114:75–85.

Lieber, M.R., Y. Ma, U. Pannicke, and K. Schwarz. 2003. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature reviews*. 4:712–20.

van Limpt, V., A. Schramm, A. van Lakeman, P. Sluis, A. Chan, M. van Noesel, F. Baas, H. Caron, A. Eggert, and R. Versteeg. 2004. The Phox2B homeobox gene is mutated in sporadic neuroblastomas. *Oncogene*. 23:9280–8.

Liu, L.F., S.D. Desai, T.K. Li, Y. Mao, M. Sun, and S.P. Sim. 2000. Mechanism of action of camptothecin. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 922:1–10.

London, W.B., C.N. Frantz, L.A. Campbell, R.C. Seeger, B.A. Brumback, S.L. Cohn, K.K. Matthay, R.P. Castleberry, and L. Diller. 2010. Phase II randomized comparison of topotecan plus cyclophosphamide versus topotecan alone in children with recurrent or refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 28:3808–15.

Look, A.T., F.A. Hayes, R. Nitschke, N.B. McWilliams, and A.A. Green. 1984. Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *The New England journal of medicine*. 311:231–5.

Look, A.T., F.A. Hayes, J.J. Shuster, E.C. Douglass, R.P. Castleberry, L.C. Bowman, E.I. Smith, and G.M. Brodeur. 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.

Lovly, C.M., and W. Pao. 2012. Escaping ALK inhibition: mechanisms of and strategies to overcome resistance. *Sci Transl Med.* 4:120ps2.

Machwe, A., L. Xiao, J. Groden, and D.K. Orren. 2006. The Werner and Bloom syndrome proteins catalyze regression of a model replication fork. *Biochemistry.* 45:13939–46.

Maeda, N., K. Ichihara-Tanaka, T. Kimura, K. Kadomatsu, T. Muramatsu, and M. Noda. 1999. A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta. *J Biol Chem.* 274:12474-9.

Maeda, S., H. Shintani, H. Kurahara, Y. Mataka, H. Noma, K. Maemura, K. Aridome, T. Yokomine, S. Natsugoe, T. Aikou, and S. Takao. 2007. Clinical significance of midkine expression in pancreatic head carcinoma. *British journal of cancer.* 97:405–11.

Maehara, H., T. Kaname, K. Yanagi, H. Hanzawa, I. Owan, T. Kinjou, K. Kadomatsu, S. Ikematsu, T. Iwamasa, F. Kanaya, and K. Naritomi. 2007. Midkine as a novel target for antibody therapy in osteosarcoma. *Biochemical and biophysical research communications.* 358:757–62.

Maliapaard, M., M.A. van Gastelen, L.A. de Jong, D. Pluim, R.C. van Waardenburg, M.C. Ruevekamp-Helmers, B.G. Froot, and J.H. Schellens. 1999. Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer research.* 59:4559–63.

Maliapaard, M., M.A. van Gastelen, A. Tohgo, F.H. Hausheer, R.C. van Waardenburg, L.A. de Jong, D. Pluim, J.H. Beijnen, and J.H. Schellens. 2001. Circumvention of breast cancer resistance protein (BCRP)-mediated resistance to camptothecins in vitro using non-substrate drugs or the BCRP inhibitor GF120918. *Clin Cancer Res.* 7:935–41.

Mao, Y., M. Sun, S.D. Desai, and L.F. Liu. 2000. SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 97:4046–51.

Maris, J.M., M.D. Hogarty, R. Bagatell, and S.L. Cohn. 2007. Neuroblastoma. *Lancet.* 369:2106–20.

Maris, J.M., Y.P. Mosse, J.P. Bradfield, C. Hou, S. Monni, R.H. Scott, S. Asgharzadeh, E.F. Attiyeh, S.J. Diskin, M. Laudenslager, C. Winter, K.A. Cole, J.T. Glessner, C. Kim, E.C. Frackelton, T. Casalunovo, A.W. Eckert, M. Capasso, E.F. Rappaport, C. McConville, W.B. London, R.C. Seeger, N. Rahman, M. Devoto, S.F. Grant, H. Li, and H. Hakonarson. 2008. Chromosome 6p22 locus associated with clinically aggressive neuroblastoma. *The New England journal of medicine.* 358:2585–93.

Maris, J.M. 2010. Recent advances in neuroblastoma. *The New England journal of medicine.* 362:2202–11.

- Martinsson, T., T. Eriksson, J. Abrahamsson, H. Caren, M. Hansson, P. Kogner, S. Kamaraj, C. Schönherr, J. Weinmar, K. Ruuth, R.H. Palmer, and B. Hallberg. 2011. Appearance of the novel activating F1174S ALK mutation in neuroblastoma correlates with aggressive tumor progression and unresponsiveness to therapy. *Cancer Res.* 71:98–105.
- Martiny-Baron, G., M.G. Kazanietz, H. Mischak, P.M. Blumberg, G. Kochs, H. Hug, D. Marme, and C. Schachtele. 1993. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *The Journal of biological chemistry.* 268:9194–7.
- Mathijssen, R.H., R.J. van Alphen, J. Verweij, W.J. Loos, K. Nooter, G. Stoter, and A. Sparreboom. 2001. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res.* 7:2182–94.
- Matthay, K.K., G. Yanik, J. Messina, A. Quach, J. Huberty, S.-C. Cheng, J. Veatch, R. Goldsby, P. Brophy, L.S. Kersun, R.A. Hawkins, and J.M. Maris. 2007. Phase II study on the effect of disease sites, age, and prior therapy on response to iodine-131-metaiodobenzylguanidine therapy in refractory neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* 25:1054–1060.
- Matthay, K.K., C.P. Reynolds, R.C. Seeger, H. Shimada, E.S. Adkins, D. Haas-Kogan, R.B. Gerbing, W.B. London, and J.G. Villablanca. 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.* 27:1007–1013.
- Mazot, P., A. Cazes, M.C. Boutterin, A. Figueiredo, V. Raynal, V. Combaret, B. Hallberg, R.H. Palmer, O. Delattre, I. Janoueix-Lerosey, and M. Vignny. 2011. The constitutive activity of the ALK mutated at positions F1174 or R1275 impairs receptor trafficking. *Oncogene.* 30:2017–2025.
- Mazot, P., A. Cazes, F. Dingli, J. Degoutin, T. Irinopoulou, M.-C. Boutterin, B. Lombard, D. Loew, B. Hallberg, R.H. Palmer, O. Delattre, I. Janoueix-Lerosey, and M. Vignny. 2012. Internalization and Down-Regulation of the ALK Receptor in Neuroblastoma Cell Lines upon Monoclonal Antibodies Treatment. *PLoS ONE.* 7:e33581.
- Mei, Y., C. Xie, W. Xie, X. Tian, M. Li, and M. Wu. 2007. Noxa/Mcl-1 balance regulates susceptibility of cells to camptothecin-induced apoptosis. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 9:871–81.
- Miao, Z.H., K. Agama, O. Sordet, L. Povirk, K.W. Kohn, and Y. Pommier. 2006. Hereditary ataxia SCAN1 cells are defective for the repair of transcription-dependent topoisomerase I cleavage complexes. *DNA repair.* 5:1489–94.
- Miller, F.D., and D.R. Kaplan. 2001. On Trk for retrograde signaling. *Neuron.* 32:767–70.
- Mirkin, B.L., S. Clark, X. Zheng, F. Chu, B.D. White, M. Greene, and A. Rebbaa. 2005. Identification of midkine as a mediator for intercellular transfer of drug resistance. *Oncogene.* 24:4965–4974.
- Miyake, K., L. Mickley, T. Litman, Z. Zhan, R. Robey, B. Cristensen, M. Brangi, L. Greenberger, M. Dean, T. Fojo, and S.E. Bates. 1999. Molecular cloning of cDNAs which are

highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer research*. 59:8–13.

Miyake, I., Y. Hakomori, A. Shinohara, T. Gamou, M. Saito, A. Iwamatsu, and R. Sakai. 2002. Activation of anaplastic lymphoma kinase is responsible for hyperphosphorylation of ShcC in neuroblastoma cell lines. *Oncogene*. 21:5823–5834.

Mo, Y.Y., C. Wang, and W.T. Beck. 2000. A novel nuclear localization signal in human DNA topoisomerase I. *The Journal of biological chemistry*. 275:41107–13.

Mo, Y.Y., Y. Yu, Z. Shen, and W.T. Beck. 2002. Nucleolar delocalization of human topoisomerase I in response to topotecan correlates with sumoylation of the protein. *The Journal of biological chemistry*. 277:2958–64.

Modak, S., and N.-K.V. Cheung. 2010. Neuroblastoma: Therapeutic strategies for a clinical enigma. *Cancer Treat. Rev*. 36:307–317.

Moreau, L.A., P. McGrady, W.B. London, H. Shimada, S.L. Cohn, J.M. Maris, L. Diller, A.T. Look, and R.E. George. 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.

Morham, S.G., K.D. Kluckman, N. Voulomanos, and O. Smithies. 1996. Targeted disruption of the mouse topoisomerase I gene by camptothecin selection. *Molecular and cellular biology*. 16:6804–9.

Morris, S.W., M.N. Kirstein, M.B. Valentine, K.G. Dittmer, D.N. Shapiro, D.L. Saltman, and A.T. Look. 1994. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 263:1281–1284.

Morris, E.J., and H.M. Geller. 1996. Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity. *The Journal of cell biology*. 134:757–70.

Mosse, Y.P., M. Laudenslager, L. Longo, K.A. Cole, A. Wood, E.F. Attiyeh, M.J. Laquaglia, R. Sennett, J.E. Lynch, P. Perri, G. Laureys, F. Speleman, C. Kim, C. Hou, H. Hakonarson, A. Torkamani, N.J. Schork, G.M. Brodeur, G.P. Tonini, E. Rappaport, M. Devoto, and J.M. Maris. 2008. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*. 455:930–5.

Mossé, Y.P., A. Wood, and J.M. Maris. 2009. Inhibition of ALK signaling for cancer therapy. *Clin. Cancer Res*. 15:5609–5614.

Mourali, J., A. Bénard, F.C. Lourenço, C. Monnet, C. Greenland, C. Moog-Lutz, C. Racaud-Sultan, D. Gonzalez-Dunia, M. Vigny, P. Mehlen, G. Delsol, and M. Allouche. 2006. Anaplastic lymphoma kinase is a dependence receptor whose proapoptotic functions are activated by caspase cleavage. *Mol. Cell. Biol*. 26:6209–6222.

Munzer, C., F. Menegaux, B. Lacour, D. Valteau-Couanet, J. Michon, C. Coze, C. Bergeron, A. Auvignon, F. Bernard, C. Thomas, J.P. Vannier, J. Kanold, H. Rubie, D. Hemon, and J.

- Clavel. 2008. Birth-related characteristics, congenital malformation, maternal reproductive history and neuroblastoma: the ESCALE study (SFCE). *International journal of cancer*. 122:2315–21.
- Muramatsu, T. 2010. Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. *Proceedings of the Japan Academy*. 86:410–25.
- Nakagawara, A., M. Arima-Nakagawara, N.J. Scavarda, C.G. Azar, A.B. Cantor, and G.M. Brodeur. 1993. Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *The New England journal of medicine*. 328:847–54.
- Nakagawara, A., C.G. Azar, N.J. Scavarda, and G.M. Brodeur. 1994. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Molecular and cellular biology*. 14:759–67.
- Nakagawara, A., J. Milbrandt, T. Muramatsu, T.F. Deuel, H. Zhao, A. Cnaan, and G.M. Brodeur. 1995. Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas. *Cancer research*. 55:1792–7.
- Nakagawara, A. 2001. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett*. 169:107–114.
- Nitiss, J., and J.C. Wang. 1988. DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85:7501–5.
- Normand, C., J. Michon, I. Janoueix-Lerosey, O. Delattre, and G. Schleiermacher. 2011. [Genetic alterations in neuroblastoma and their usefulness for clinical management]. *Bull Cancer*. 98:477–488.
- Norris, M.D., J. Smith, K. Tanabe, P. Tobin, C. Flemming, G.L. Scheffer, P. Wielinga, S.L. Cohn, W.B. London, G.M. Marshall, J.D. Allen, and M. Haber. 2005. Expression of multidrug transporter MRP4/ABCC4 is a marker of poor prognosis in neuroblastoma and confers resistance to irinotecan in vitro. *Mol. Cancer Ther*. 4:547–553.
- O'Brien, T., D. Cranston, S. Fuggle, R. Bicknell, and A.L. Harris. 1996. The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer research*. 56:2515–8.
- Oberthuer, A., F. Berthold, P. Warnat, B. Hero, Y. Kahlert, R. Spitz, K. Ernestus, R. Konig, S. Haas, R. Eils, M. Schwab, B. Brors, F. Westermann, and M. Fischer. 2006. Customized oligonucleotide microarray gene expression-based classification of neuroblastoma patients outperforms current clinical risk stratification. *J Clin Oncol*. 24:5070–8.
- Oehme, I., H.E. Deubzer, M. Lodrini, T. Milde, and O. Witt. 2009. Targeting of HDAC8 and investigational inhibitors in neuroblastoma. *Expert Opin Investig Drugs*. 18:1605–1617.
- Ohira, M., S. Oba, Y. Nakamura, E. Isogai, S. Kaneko, A. Nakagawa, T. Hirata, H. Kubo, T. Goto, S. Yamada, Y. Yoshida, M. Fuchioka, S. Ishii, and A. Nakagawara. 2005. Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate risk neuroblastomas. *Cancer cell*. 7:337–50.



- Okumura, K., S. Huang, and F.A. Sinicrope. 2008. Induction of Noxa sensitizes human colorectal cancer cells expressing Mcl-1 to the small-molecule Bcl-2/Bcl-xL inhibitor, ABT-737. *Clin Cancer Res.* 14:8132–42.
- Opel, D., C. Poremba, T. Simon, K.-M. Debatin, and S. Fulda. 2007. Activation of Akt predicts poor outcome in neuroblastoma. *Cancer Res.* 67:735–745.
- Osajima-Hakomori, Y., I. Miyake, M. Ohira, A. Nakagawara, A. Nakagawa, and R. Sakai. 2005. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *The American journal of pathology.* 167:213–22.
- Osenga, K.L., J.A. Hank, M.R. Albertini, J. Gan, A.G. Sternberg, J. Eickhoff, R.C. Seeger, K.K. Matthay, C.P. Reynolds, C. Twist, M. Krailo, P.C. Adamson, R.A. Reisfeld, S.D. Gillies, and P.M. Sondel. 2006. A phase I clinical trial of the hu14.18-IL2 (EMD 273063) as a treatment for children with refractory or recurrent neuroblastoma and melanoma: a study of the Children's Oncology Group. *Clin. Cancer Res.* 12:1750–1759.
- Pajic, M., M.D. Norris, S.L. Cohn, and M. Haber. 2005. The role of the multidrug resistance-associated protein 1 gene in neuroblastoma biology and clinical outcome. *Cancer letters.* 228:241–6.
- Park, S.Y., W. Lam, and Y.C. Cheng. 2002. X-ray repair cross-complementing gene I protein plays an important role in camptothecin resistance. *Cancer research.* 62:459–65.
- Park, J.R., J.R. Scott, C.F. Stewart, W.B. London, A. Naranjo, V.M. Santana, P.J. Shaw, S.L. Cohn, and K.K. Matthay. 2011. Pilot induction regimen incorporating pharmacokinetically guided topotecan for treatment of newly diagnosed high-risk neuroblastoma: a Children's Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* 29:4351–4357.
- Passoni, L., L. Longo, P. Collini, A.M. Coluccia, F. Bozzi, M. Podda, A. Gregorio, C. Gambini, A. Garaventa, V. Pistoia, F. Del Grosso, G.P. Tonini, M. Cheng, C. Gambacorti-Passerini, A. Anichini, F. Fossati-Bellani, M. Di Nicola, and R. Luksch. 2009. Mutation-independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis neuroblastoma patients. *Cancer research.* 69:7338–46.
- Petrelli, A., and S. Giordano. 2008. From single- to multi-target drugs in cancer therapy: when aspecificity becomes an advantage. *Curr. Med. Chem.* 15:422–432.
- Pichierri, P., A. Franchitto, P. Mosesso, and F. Palitti. 2000. Werner's syndrome cell lines are hypersensitive to camptothecin-induced chromosomal damage. *Mutation research.* 456:45–57.
- Pichierri, P., A. Franchitto, P. Mosesso, and F. Palitti. 2001. Werner's syndrome protein is required for correct recovery after replication arrest and DNA damage induced in S-phase of cell cycle. *Molecular biology of the cell.* 12:2412–21.
- Pingoud-Meier, C., D. Lang, A.J. Janss, L.B. Rorke, P.C. Phillips, T. Shalaby, and M.A. Grotzer. 2003. Loss of caspase-8 protein expression correlates with unfavorable survival outcome in childhood medulloblastoma. *Clin Cancer Res.* 9:6401–9.

- Plantaz, D., J. Vandesompele, N. Van Roy, M. Lastowska, N. Bown, V. Combaret, M.C. Favrot, O. Delattre, J. Michon, J. Benard, O. Hartmann, J.C. Nicholson, F.M. Ross, C. Brinkschmidt, G. Laureys, H. Caron, K.K. Matthay, B.G. Feuerstein, and F. Speleman. 2001. Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification. *International journal of cancer*. 91:680–6.
- Plo, I., Z.Y. Liao, J.M. Barcelo, G. Kohlhagen, K.W. Caldecott, M. Weinfeld, and Y. Pommier. 2003. Association of XRCC1 and tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) for the repair of topoisomerase I-mediated DNA lesions. *DNA repair*. 2:1087–100.
- Polgar, O., R.W. Robey, and S.E. Bates. 2008. ABCG2: structure, function and role in drug response. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 4:1–15.
- Pommier, Y., C. Redon, V.A. Rao, J.A. Seiler, O. Sordet, H. Takemura, S. Antony, L. Meng, Z. Liao, G. Kohlhagen, H. Zhang, and K.W. Kohn. 2003. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutation research*. 532:173–203.
- Pommier, Y. 2006 (a). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature reviews*. 6:789–802.
- Pommier, Y., J.M. Barcelo, V.A. Rao, O. Sordet, A.G. Jobson, L. Thibaut, Z.H. Miao, J.A. Seiler, H. Zhang, C. Marchand, K. Agama, J.L. Nitiss, and C. Redon. 2006 (b). Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 81:179–229.
- Pommier, Y. 2009. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chemical reviews*. 109:2894–902.
- Pommier, Y., E. Leo, H. Zhang, and C. Marchand. 2010. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & biology*. 17:421–33.
- Pourquier, P., L.M. Ueng, G. Kohlhagen, A. Mazumder, M. Gupta, K.W. Kohn, and Y. Pommier. 1997 (a). Effects of uracil incorporation, DNA mismatches, and abasic sites on cleavage and religation activities of mammalian topoisomerase I. *J. Biol. Chem*. 272:7792–7796.
- Pourquier, P., A.A. Pilon, G. Kohlhagen, A. Mazumder, A. Sharma, and Y. Pommier. 1997 (b). Trapping of mammalian topoisomerase I and recombinations induced by damaged DNA containing nicks or gaps. Importance of DNA end phosphorylation and camptothecin effects. *J. Biol. Chem*. 272:26441–26447.
- Pourquier, P., L.M. Ueng, J. Fertala, D. Wang, H.J. Park, J.M. Essigmann, M.A. Bjornsti, and Y. Pommier. 1999. Induction of reversible complexes between eukaryotic DNA topoisomerase I and DNA-containing oxidative base damages. 7, 8-dihydro-8-oxoguanine and 5-hydroxycytosine. *J. Biol. Chem*. 274:8516–8523.
- Pourquier, P., and Y. Pommier. 2001. Topoisomerase I-mediated DNA damage. *Advances in cancer research*. 80:189–216.

- Pourquier, P., and A. Lansiaux. 2011. [Molecular determinants of response to topoisomerase I inhibitors]. *Bull Cancer*. 98:1287–1298.
- Rallabhandi, P., K. Hashimoto, Y.Y. Mo, W.T. Beck, P.K. Moitra, and P. D'Arpa. 2002. Sumoylation of topoisomerase I is involved in its partitioning between nucleoli and nucleoplasm and its clearing from nucleoli in response to camptothecin. *The Journal of biological chemistry*. 277:40020–6.
- Rasouli-Nia, A., F. Karimi-Busheri, and M. Weinfeld. 2004. Stable down-regulation of human polynucleotide kinase enhances spontaneous mutation frequency and sensitizes cells to genotoxic agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:6905–10.
- Redinbo, M.R., J.J. Champoux, and W.G. Hol. 2000. Novel insights into catalytic mechanism from a crystal structure of human topoisomerase I in complex with DNA. *Biochemistry*. 39:6832–40.
- Reiff, T., L. Huber, M. Kramer, O. Delattre, I. Janoueix-Lerosey, and H. Rohrer. 2011. Midkine and Alk signaling in sympathetic neuron proliferation and neuroblastoma predisposition. *Development (Cambridge, England)*. 138:4699–708.
- Reiprich, S., C.C. Stolt, S. Schreiner, R. Parlato, and M. Wegner. 2008. SoxE proteins are differentially required in mouse adrenal gland development. *Molecular biology of the cell*. 19:1575–86.
- Rikova, K., A. Guo, Q. Zeng, A. Possemato, J. Yu, H. Haack, J. Nardone, K. Lee, C. Reeves, Y. Li, Y. Hu, Z. Tan, M. Stokes, L. Sullivan, J. Mitchell, R. Wetzel, J. Macneill, J.M. Ren, J. Yuan, C.E. Bakalarski, J. Villen, J.M. Kornhauser, B. Smith, D. Li, X. Zhou, S.P. Gygi, T.-L. Gu, R.D. Polakiewicz, J. Rush, and M.J. Comb. 2007. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*. 131:1190–1203.
- Rothenberg, M.L. 1996. CPT-11: an original spectrum of clinical activity. *Seminars in oncology*. 23:21–6.
- Roy Choudhury, S., S. Karmakar, N.L. Banik, and S.K. Ray. 2012. Targeting angiogenesis for controlling neuroblastoma. *J Oncol*. 2012:782020.
- Sartelet, H., L.-L. Oligny, and G. Vassal. 2008. AKT pathway in neuroblastoma and its therapeutic implication. *Expert Rev Anticancer Ther*. 8:757–769.
- Sartelet, H., T. Imbriglio, C. Nyalendo, E. Haddad, B. Annabi, M. Duval, R. Fetni, K. Victor, L. Alexendrov, D. Sinnott, M. Fabre, and G. Vassal. 2012. CD133 expression is associated with poor outcome in neuroblastoma via chemoresistance mediated by the AKT pathway. *Histopathology*.
- Sasaki, T., K. Okuda, W. Zheng, J. Butrynski, M. Capelletti, L. Wang, N.S. Gray, K. Wilner, J.G. Christensen, G. Demetri, G.I. Shapiro, S.J. Rodig, M.J. Eck, and P.A. Jänne. 2010. The neuroblastoma-associated F1174L ALK mutation causes resistance to an ALK kinase inhibitor in ALK-translocated cancers. *Cancer Res*. 70:10038–10043.

Sauka-Spengler, T., and M. Bronner-Fraser. 2008. Evolution of the neural crest viewed from a gene regulatory perspective. *Genesis*. 46:673–82.

Schellens, J.H., M. Maliepaard, R.J. Scheper, G.L. Scheffer, J.W. Jonker, J.W. Smit, J.H. Beijnen, and A.H. Schinkel. 2000. Transport of topoisomerase I inhibitors by the breast cancer resistance protein. Potential clinical implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 922:188–94.

Schilling, F.H., C. Spix, F. Berthold, R. Erttmann, J. Sander, J. Treuner, and J. Michaelis. 2003. Children may not benefit from neuroblastoma screening at 1 year of age. Updated results of the population based controlled trial in Germany. *Cancer letters*. 197:19–28.

Schönherr, C., K. Ruuth, S. Kamaraj, C.-L. Wang, H.-L. Yang, V. Combaret, A. Djos, T. Martinsson, J.G. Christensen, R.H. Palmer, and B. Hallberg. 2012. Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) regulates initiation of transcription of MYCN in neuroblastoma cells. *Oncogene*.

Schulte, J.H., H.S. Bachmann, B. Brockmeyer, K. Depreter, A. Oberthur, S. Ackermann, Y. Kahlert, K. Pajtler, J. Theissen, F. Westermann, J. Vandesompele, F. Speleman, F. Berthold, A. Eggert, B. Brors, B. Hero, A. Schramm, and M. Fischer. 2010 High ALK receptor tyrosine kinase expression supersedes ALK mutation as a determining factor of an unfavorable phenotype in primary neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 17:5082–92.

Schulte, A. Schramm, C. Van Den Broecke, J. Vermeulen, N. Van Roy, K. Beiske, M. Renard, R. Noguera, O. Delattre, I. Janoueix-Lerosey, P. Kogner, T. Martinsson, A. Nakagawara, M. Ohira, H. Caron, A. Eggert, J. Cools, R. Versteeg, and F. Speleman. 2010. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin. Cancer Res*. 16:4353–4362.

Schulze-Bergkamen, H., R. Ehrenberg, L. Hickmann, B. Vick, T. Urbanik, C.C. Schimanski, M.R. Berger, A. Schad, A. Weber, S. Heeger, P.R. Galle, and M. Moehler. 2008. Bcl-x(L) and Myeloid cell leukaemia-1 contribute to apoptosis resistance of colorectal cancer cells. *World J Gastroenterol*. 14:3829–40.

Schuz, J., T. Weihkopf, and P. Kaatsch. 2007. Medication use during pregnancy and the risk of childhood cancer in the offspring. *European journal of pediatrics*. 166:433–41.

Seeger, R.C., G.M. Brodeur, H. Sather, A. Dalton, S.E. Siegel, K.Y. Wong, and D. Hammond. 1985. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *The New England journal of medicine*. 313:1111–6.

Serra, A., B. Haberle, I.R. Konig, R. Kappler, M. Suttorp, H.K. Schackert, D. Roesner, and G. Fitze. 2008. Rare occurrence of PHOX2b mutations in sporadic neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol*. 30:728–32.

Shao, R.G., C.X. Cao, T. Shimizu, P.M. O'Connor, K.W. Kohn, and Y. Pommier. 1997. Abrogation of an S-phase checkpoint and potentiation of camptothecin cytotoxicity by 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in human cancer cell lines, possibly influenced by p53 function. *Cancer research*. 57:4029–35.

- Shiloh, Y., and A.R. Lehmann. 2004a. Maintaining integrity. *Nature cell biology*. 6:923–8.
- Shimada, H., S. Umehara, Y. Monobe, Y. Hachitanda, A. Nakagawa, S. Goto, R.B. Gerbing, D.O. Stram, J.N. Lukens, and K.K. Matthay. 2001. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer*. 92:2451–61.
- Shusterman, S., and J.M. Maris. 2005. Prospects for therapeutic inhibition of neuroblastoma angiogenesis. *Cancer Lett*. 228:171–179.
- Sirikantaramas, S., M. Yamazaki, and K. Saito. 2008. Mutations in topoisomerase I as a self-resistance mechanism coevolved with the production of the anticancer alkaloid camptothecin in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:6782–6.
- Soda, M., Y.L. Choi, M. Enomoto, S. Takada, Y. Yamashita, S. Ishikawa, S. Fujiwara, H. Watanabe, K. Kurashina, H. Hatanaka, M. Bando, S. Ohno, Y. Ishikawa, H. Aburatani, T. Niki, Y. Sohara, Y. Sugiyama, and H. Mano. 2007. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 448:561–566.
- Sordet, O., Q.A. Khan, K.W. Kohn, and Y. Pommier. 2003. Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *Current medicinal chemistry*. 3:271–90.
- Sordet, O., C.E. Redon, J. Guirouilh-Barbat, S. Smith, S. Solier, C. Douarre, C. Conti, A.J. Nakamura, B.B. Das, E. Nicolas, K.W. Kohn, W.M. Bonner, and Y. Pommier. 2009. Ataxia telangiectasia mutated activation by transcription- and topoisomerase I-induced DNA double-strand breaks. *EMBO Rep*. 10:887–893.
- Spitz, R., D.R. Betts, T. Simon, M. Boensch, J. Oestreich, F.K. Niggli, K. Ernestus, F. Berthold, and B. Hero. 2006. Favorable outcome of triploid neuroblastomas: a contribution to the special oncogenesis of neuroblastoma. *Cancer genetics and cytogenetics*. 167:51–6.
- Staker, B.L., M.D. Feese, M. Cushman, Y. Pommier, D. Zembower, L. Stewart, and A.B. Burgin. 2005. Structures of three classes of anticancer agents bound to the human topoisomerase I-DNA covalent complex. *Journal of medicinal chemistry*. 48:2336–45.
- Staron, K., B. Kowalska-Loth, K. Nieznanski, and I. Szumiel. 1996. Phosphorylation of topoisomerase I in L5178Y-S cells is associated with poly(ADP-ribose) metabolism. *Carcinogenesis*. 17:383–7.
- Stewart, L., G.C. Ireton, and J.J. Champoux. 1997. Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation. *Journal of molecular biology*. 269:355–72.
- Stewart, L., M.R. Redinbo, X. Qiu, W.G. Hol, and J.J. Champoux. 1998. A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science (New York, N.Y.)*. 279:1534–41.
- Sung, P., and H. Klein. 2006. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nature reviews*. 7:739–50.
- Takagi, K., T.S. Dexheimer, C. Redon, O. Sordet, K. Agama, G. Lavielle, A. Pierre, S.E. Bates, and Y. Pommier. 2007. Novel E-ring camptothecin keto analogues (S38809 and

- S39625) are stable, potent, and selective topoisomerase I inhibitors without being substrates of drug efflux transporters. *Molecular cancer therapeutics*. 6:3229–38.
- Takahashi, T., Y. Fujiwara, M. Yamakido, O. Katoh, H. Watanabe, and P.I. Mackenzie. 1997. The role of glucuronidation in 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin resistance in vitro. *Jpn J Cancer Res*. 88:1211–7.
- Tanabe, K., M. Matsumoto, S. Ikematsu, S. Nagase, A. Hatakeyama, T. Takano, H. Niikura, K. Ito, K. Kadomatsu, S. Hayashi, and N. Yaegashi. 2008. Midkine and its clinical significance in endometrial carcinoma. *Cancer science*. 99:1125–30.
- Tanizaki, J., I. Okamoto, K. Takezawa, K. Sakai, K. Azuma, K. Kuwata, H. Yamaguchi, E. Hatashita, K. Nishio, P.A. Janne, and K. Nakagawa. 2012. Combined effect of ALK and MEK inhibitors in EML4-ALK-positive non-small-cell lung cancer cells. *Br. J. Cancer*. 106:763–767.
- Tanizawa, A., R. Beirand, G. Kohlhagen, A. Tabuchi, J. Jenkins, and Y. Pommier. 1993. Cloning of Chinese hamster DNA topoisomerase I cDNA and identification of a single point mutation responsible for camptothecin resistance. *The Journal of biological chemistry*. 268:25463–8.
- Teicher, B.A. 2008. Next generation topoisomerase I inhibitors: Rationale and biomarker strategies. *Biochemical pharmacology*. 75:1262–71.
- Teitz, T., T. Wei, M.B. Valentine, E.F. Vanin, J. Grenet, V.A. Valentine, F.G. Behm, A.T. Look, J.M. Lahti, and V.J. Kidd. 2000. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nature medicine*. 6:529–35.
- Thompson, J., W.C. Zamboni, P.J. Cheshire, L. Lutz, X. Luo, Y. Li, J.A. Houghton, C.F. Stewart, and P.J. Houghton. 1997. Efficacy of systemic administration of irinotecan against neuroblastoma xenografts. *Clin Cancer Res*. 3:423–31.
- Toyoda, E., A. Kurosawa, M. Fujii, and N. Adachi. 2009. Heterozygous disruption of the DNA topoisomerase I gene confers cellular resistance to camptothecin in human cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 32:724–7.
- Tredan, O., C.M. Galmarini, K. Patel, and I.F. Tannock. 2007. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*. 99:1441–54.
- Tsubono, Y., and S. Hisamichi. 2004. A halt to neuroblastoma screening in Japan. *The New England journal of medicine*. 350:2010–1.
- Tsurutani, J., T. Nitta, T. Hirashima, T. Komiya, H. Uejima, H. Tada, N. Syunichi, A. Tohda, M. Fukuoka, and K. Nakagawa. 2002. Point mutations in the topoisomerase I gene in patients with non-small cell lung cancer treated with irinotecan. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 35:299–304.
- Turner, S.D., and D.R. Alexander. 2005. What have we learnt from mouse models of NPM-ALK-induced lymphomagenesis? *Leukemia*. 19:1128–34.

- Tweddle, D.A., A.J. Malcolm, N. Bown, A.D. Pearson, and J. Lunec. 2001. Evidence for the development of p53 mutations after cytotoxic therapy in a neuroblastoma cell line. *Cancer research*. 61:8–13.
- Ueda, K., C. Cardarelli, M.M. Gottesman, and I. Pastan. 1987. Expression of a full-length cDNA for the human “MDR1” gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84:3004–8.
- Vacherot, F., D. Caruelle, D. Chopin, S. Gil-Diez, D. Barritault, J.P. Caruelle, and J. Courty. 1999. Involvement of heparin affn regulatory peptide in human prostate cancer. *Prostate*. 38:126–136.
- Vance, J.R., and T.E. Wilson. 2001. Repair of DNA strand breaks by the overlapping functions of lesion-specific and non-lesion-specific DNA 3’ phosphatases. *Molecular and cellular biology*. 21:7191–8.
- Vassal, G., C. Pondarre, C. Cappelli, M.J. Terrier-Lacombe, I. Boland, J. Morizet, J. Benard, A.M. Venuat, P. Ardouin, O. Hartmann, and A. Gouyette. 1997. DNA-topoisomerase I, a new target for the treatment of neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 33:2011–5.
- Verissimo, C.S., J.J. Molenaar, C.P. Fitzsimons, and E. Vreugdenhil. 2011. Neuroblastoma therapy: what is in the pipeline? *Endocr. Relat. Cancer*. 18:R213–231.
- Vermeulen, J., K. De Preter, A. Naranjo, L. Vercruyssen, N. Van Roy, J. Hellemans, K. Swerts, S. Bravo, P. Scaruffi, G.P. Tonini, B. De Bernardi, R. Noguera, M. Piqueras, A. Cañete, V. Castel, I. Janoueix-Lerosey, O. Delattre, G. Schleiermacher, J. Michon, V. Combaret, M. Fischer, A. Oberthuer, P.F. Ambros, K. Beiske, J. Bénard, B. Marques, H. Rubie, J. Kohler, U. Pötschger, R. Ladenstein, M.D. Hogarty, P. McGrady, W.B. London, G. Laureys, F. Speleman, and J. Vandesompele. 2009. Predicting outcomes for children with neuroblastoma using a multigene-expression signature: a retrospective SIOPEN/COG/GPOH study. *Lancet Oncol*. 10:663–671.
- Wagner, L.M., and M.K. Danks. 2009. New therapeutic targets for the treatment of high-risk neuroblastoma. *J. Cell. Biochem*. 107:46–57.
- Wakamatsu, Y., Y. Watanabe, H. Nakamura, and H. Kondoh. 1997. Regulation of the neural crest cell fate by N-myc: promotion of ventral migration and neuronal differentiation. *Development (Cambridge, England)*. 124:1953–62.
- Wall, M.E., and M.C. Wani. 1995. Camptothecin and taxol: discovery to clinic--thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer research*. 55:753–60.
- Wang, Z., and P. Droge. 1996. Differential control of transcription-induced and overall DNA supercoiling by eukaryotic topoisomerases in vitro. *The EMBO journal*. 15:581–9.
- Wei, J.S., B.T. Greer, F. Westermann, S.M. Steinberg, C.G. Son, Q.R. Chen, C.C. Whiteford, S. Bilke, A.L. Krasnoselsky, N. Cenacchi, D. Catchpoole, F. Berthold, M. Schwab, and J. Khan. 2004. Prediction of clinical outcome using gene expression profiling and artificial neural networks for patients with neuroblastoma. *Cancer research*. 64:6883–91.

Wellstein, A., W.J. Fang, A. Khatri, Y. Lu, S.S. Swain, R.B. Dickson, J. Sasse, A.T. Riegel, and M.E. Lippman. 1992. A heparin-binding growth factor secreted from breast cancer cells homologous to a developmentally regulated cytokine. *J. Biol. Chem.* 267:2582–2587.

Wellstein, A., and J.A. Toretsky. 2011. Hunting ALK to feed targeted cancer therapy. *Nat. Med.* 17:290–291.

Westermann, F., and M. Schwab. 2002. Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer letters.* 184:127–47.

Woods, W.G., R.N. Gao, J.J. Shuster, L.L. Robison, M. Bernstein, S. Weitzman, G. Bunin, I. Levy, J. Brossard, G. Dougherty, M. Tuchman, and B. Lemieux. 2002. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *The New England journal of medicine.* 346:1041–6.

Wu, J., and L.F. Liu. 1997. Processing of topoisomerase I cleavable complexes into DNA damage by transcription. *Nucleic acids research.* 25:4181–6.

[www.embryology.ch](http://www.embryology.ch)

[www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)

Yalçın, B., L.C. Kremer, H.N. Caron, and E.C. van Dalen. 2010. High-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell rescue for children with high-risk neuroblastoma. *Cochrane Database Syst Rev.* CD006301.

Yang, Q., C.M. Kiernan, Y. Tian, H.R. Salwen, A. Chlenski, B.A. Brumback, W.B. London, and S.L. Cohn. 2007. Methylation of CASP8, DCR2, and HIN-1 in neuroblastoma is associated with poor outcome. *Clin Cancer Res.* 13:3191–7.

Yano, S., S. Takeuchi, T. Nakagawa, and T. Yamada. 2012. Ligand-triggered resistance to molecular targeted drugs in lung cancer: roles of HGF and EGFR ligands. *Cancer Science.*

Yu, A.L., A.L. Gilman, M.F. Ozkaynak, W.B. London, S.G. Kreissman, H.X. Chen, M. Smith, B. Anderson, J.G. Villablanca, K.K. Matthay, H. Shimada, S.A. Grupp, R. Seeger, C.P. Reynolds, A. Buxton, R.A. Reisfeld, S.D. Gillies, S.L. Cohn, J.M. Maris, and P.M. Sondel. 2010. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* 363:1324–1334.

Zhang, H., P. D'Arpa, and L.F. Liu. 1990. A model for tumor cell killing by topoisomerase poisons. *Cancer Cells.* 2:23–7.

Zhang, H., J.M. Barcelo, B. Lee, G. Kohlhagen, D.B. Zimonjic, N.C. Popescu, and Y. Pommier. 2001. Human mitochondrial topoisomerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 98:10608–13.

Zhang, J., C. Cheng, C.L. He, Y.J. Zhou, and Y. Cao. 2008. The expression of Bcl-XL, Bcl-XS and p27Kip1 in topotecan-induced apoptosis in hepatoblastoma HepG2 cell line. *Cancer investigation.* 26:456–63.

Zhang, X., S. Zhang, X. Yang, J. Yang, Q. Zhou, L. Yin, S. An, J. Lin, S. Chen, Z. Xie, M. Zhu, X. Zhang, and Y. Wu. 2010. Fusion of EML4 and ALK is associated with development



of lung adenocarcinomas lacking EGFR and KRAS mutations and is correlated with ALK expression. *Mol. Cancer*. 9:188.

Zhao, H., F. Traganos, and Z. Darzynkiewicz. 2008. Phosphorylation of p53 on Ser15 during cell cycle caused by Topo I and Topo II inhibitors in relation to ATM and Chk2 activation. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 7:3048–55.

Zhu, S., J.-S. Lee, F. Guo, J. Shin, A.R. Perez-Atayde, J.L. Kutok, S.J. Rodig, D.S. Neuberg, D. Helman, H. Feng, R.A. Stewart, W. Wang, R.E. George, J.P. Kanki, and A.T. Look. 2012. Activated ALK Collaborates with MYCN in Neuroblastoma Pathogenesis. *Cancer Cell*. 21:362–373.

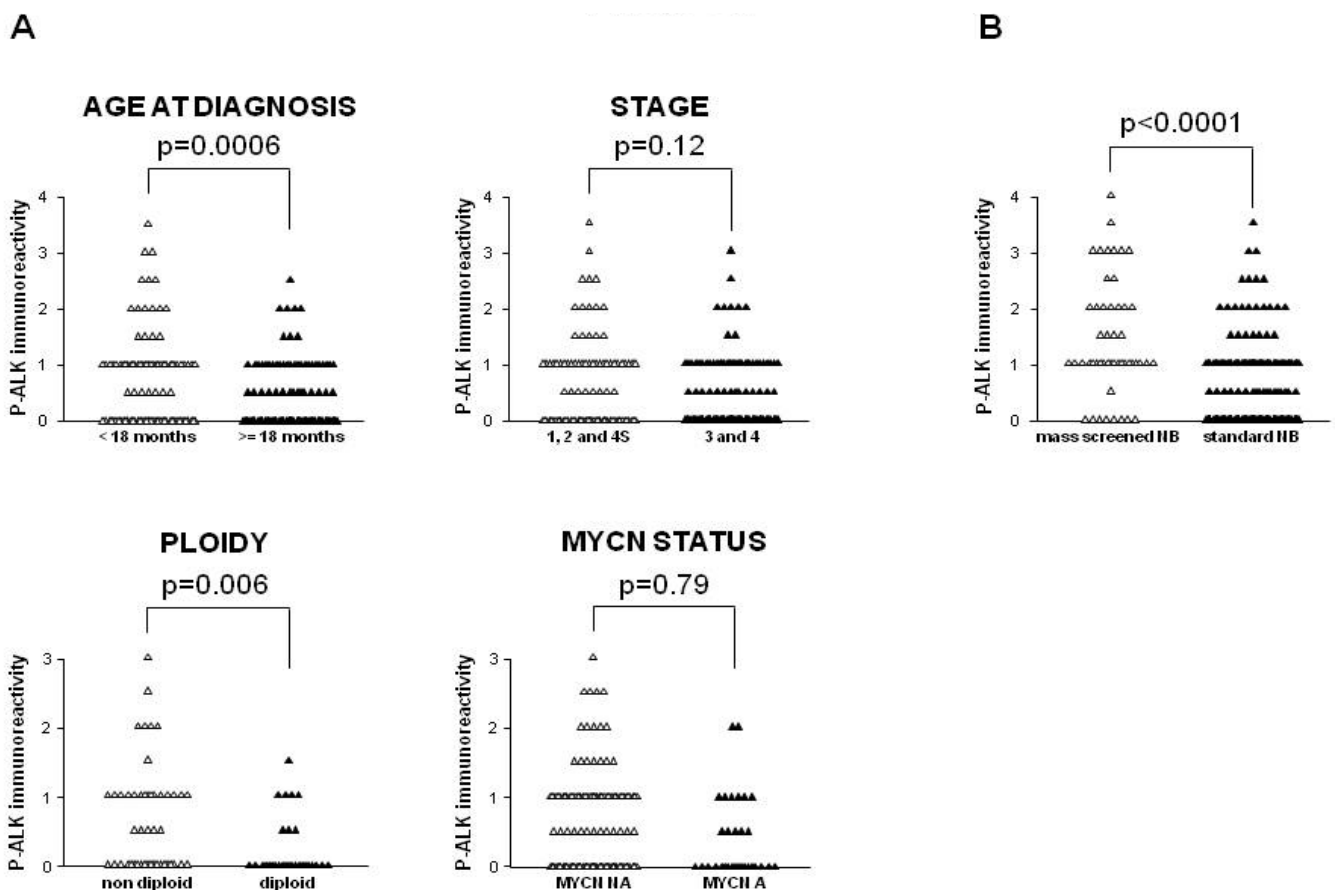
Zou, H.Y., Q. Li, J.H. Lee, M.E. Arango, S.R. McDonnell, S. Yamazaki, T.B. Koudriakova, G. Alton, J.J. Cui, P.-P. Kung, M.D. Nambu, G. Los, S.L. Bender, B. Mroczkowski, and J.G. Christensen. 2007. An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res*. 67:4408–4417.

# ANNEXES

Table S1. Antitumor activity of TAE684 against IGR-NB8, IGR-N835 and CLB-GA neuroblastoma xenografts

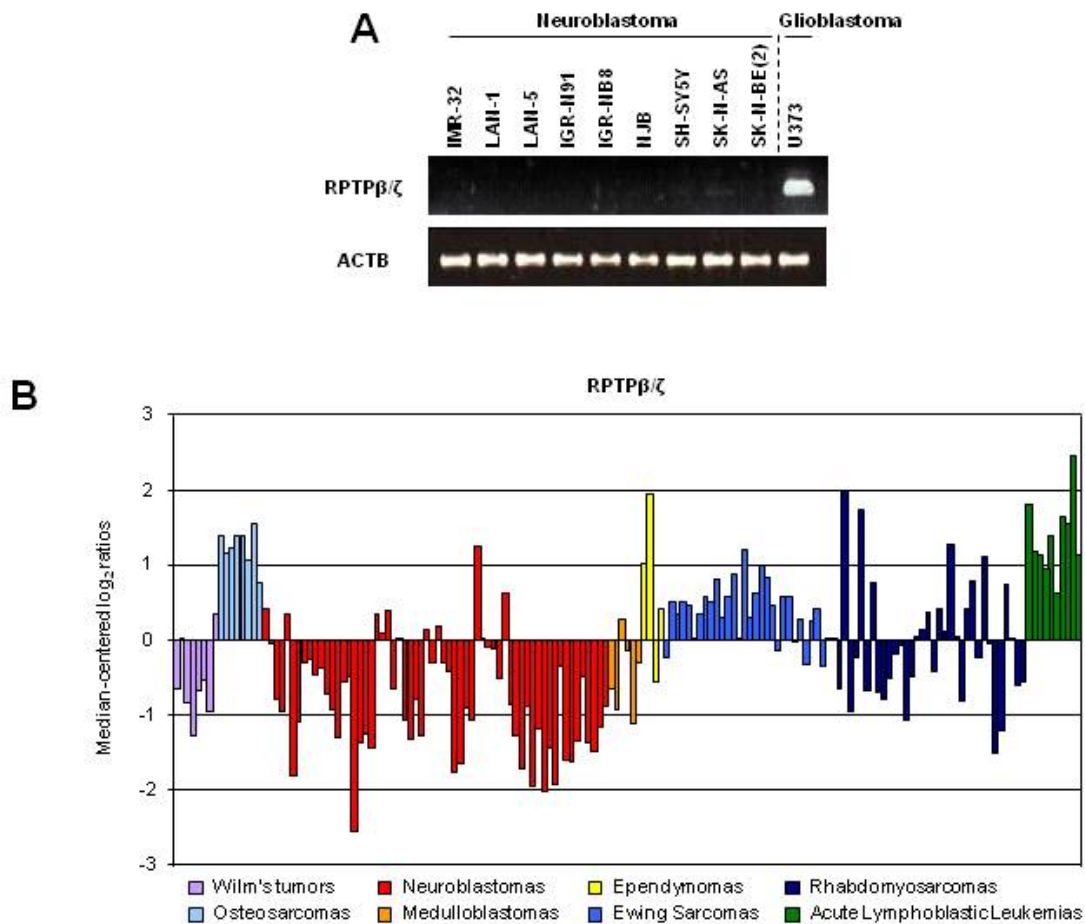
Xenograft	Dose (mg/kg/day)	Schedule / route	Total dose (mg/kg)	BWL (%)	Deaths	TGD (days)	CR	TFS
IGR-NB8 (WT ALK)	1	daily x21 / PO	21	4.1 ± 2.6	0	-3	0	0
	3	daily x21 / PO	63	5.6 ± 3.5	0	15	0	0
	10	daily x21 / PO	210	3.4 ± 3.6	0	5	0	0
IGR-N835 (F1174I ALK)	1	daily x21 / PO	21	6.2 ± 4.5	0	-2	0	0
	3	daily x21 / PO	63	3.3 ± 3.5	0	-4	0	0
	10	daily x21 / PO	210	1.0 ± 2.1	0	2	0	0
CLB-GA (R1275Q ALK)	1	daily x21 / PO	21	3.9 ± 0.2	0	10	0	0
	3	daily x21 / PO	63	9.0 ± 7.1	0	26	0	0
	10	daily x21 / PO	210	3.9 ± 2.5	0	45	2	1

BWL, maximum body weight loss (mean ± SD); TGD, tumor growth delay; CR, complete regression; TFS, tumor-free survivor

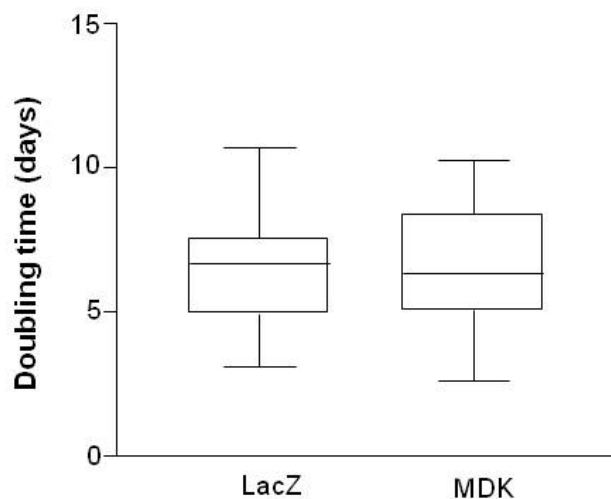


Supplemental figure 1 – ALK activation in favorable and unfavorable neuroblastomas.

(A) Comparison of P-ALK immunostaining scores in neuroblastic tumors across favorable ( $\Delta$ ) and unfavorable ( $\blacktriangle$ ) prognostic subsets of patients. MYCN NA, MYCN non-amplified; MYCN A, MYCN amplified. Each triangle represents an individual tumor. (B) Comparison of P-ALK immunostaining scores between mass screened ( $\Delta$ ) and standard ( $\blacktriangle$ ) neuroblastomas. NB, neuroblastomas. Each triangle represents an individual tumor.

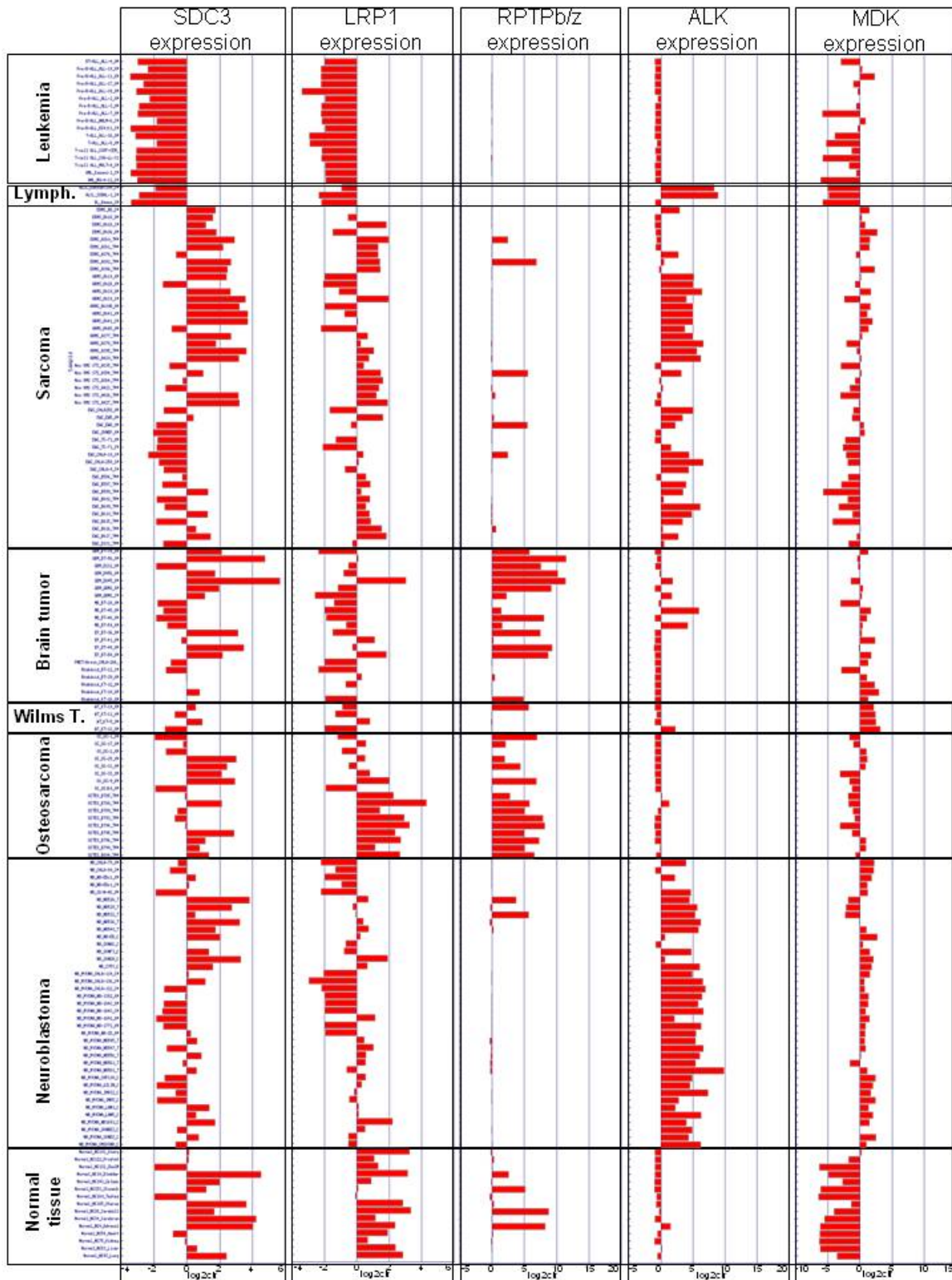


**Supplemental figure 2 – Expression of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta (RPTPβ/ζ) in neuroblastoma.** (A) RT-PCR analysis of RPTPβ/ζ mRNA levels in human neuroblastoma cell lines. U373 human glioblastoma cells were used as a positive control. ACTB (β-actin) was used as an amplification control. (B) RPTPβ/ζ expression profiling across different pediatric cancers. Results were obtained using publicly available DNA microarray data from 163 samples (70 primary tumors, 75 xenografts and 18 cell lines). Samples are grouped by cancer type (on the X-axis) and results are shown as median-centered log<sub>2</sub> ratios (on the Y-axis).



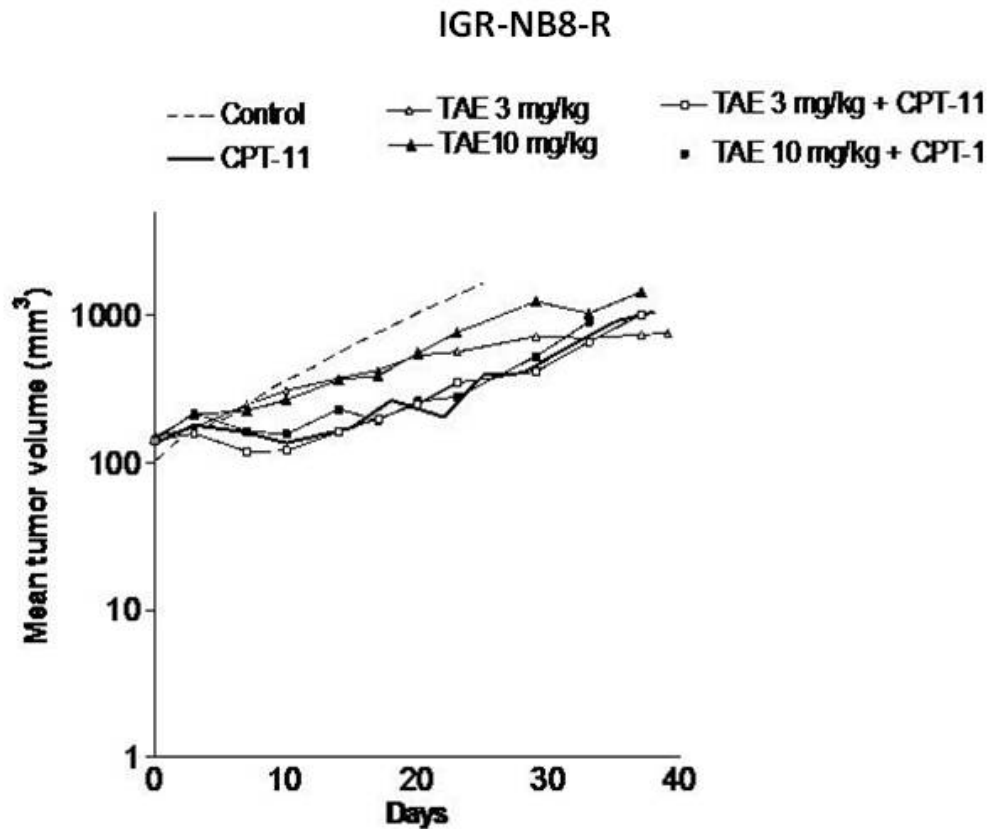
**Supplemental figure 3 – *In vivo* MDK-encoding DNAs electrotransfer does not modify the growth of neuroblastoma xenograft (IGR-NB8-R, expressing a WT ALK).**

Effect of MDK overexpression on the growth of neuroblastoma xenografts, evaluated by calculating the doubling time. Box plots represent results of three independent experiments including at least 5 mice/group.



**Supplemental figure 4 – mRNA expression of SDC3, LRP1 and RPTPβ/ζ in pediatric tumors**

Expression profiling analyses were performed using the publicly available Pediatric Tumor Affymetrix Database (Whiteford et al., 2007) (<http://pob.abcc.ncifcrf.gov/cgi-bin/JK>). The database was searched by querying SDC3, LRP1, PTPRZ1 (gene symbol for RPTPβ/ζ), ALK and MDK. Bar-charts represent output median-centered log<sub>2</sub> ratios.



**Supplemental figure 5 – *In vivo* activity of the small-molecule ALK inhibitor TAE684 in association with CPT-11 against neuroblastoma xenografts with different ALK mutation status.** Evolution of tumor growth in IGR-NB8-R (wild-type ALK) and CLB-GA (R1275Q ALK) neuroblastoma xenografts treated with TAE684 at 1, 3 or 10 mg/kg/day an/or CPT-11 27 mg/kg during 21 days and 5 days, respectively . Mean tumor volumes are shown.

## RESUME

Les neuroblastomes, même de haut risque répondent bien à la chimiothérapie initiale mais deviendront fréquemment résistants au traitement. Les inhibiteurs de topoisomérase I représentent un outil thérapeutique important dans la prise en charge des neuroblastomes réfractaires. Pour étudier la résistance aux inhibiteurs de topoisomérase I acquise dans un contexte thérapeutique, un modèle murin de neuroblastome résistant au CPT-11 a été développé. La chimiorésistance est connue comme un phénomène multifactoriel. Nous avons donc utilisé plusieurs approches pour mieux caractériser les mécanismes à l'origine de la résistance dans notre modèle. Une approche génomique a permis d'identifier la dérégulation de la voie de signalisation formée du récepteur ALK et de deux ligands PTN et MDK. Alors que ALK est décrit comme gène majeur de prédisposition au neuroblastome, principalement par le biais de mutations activatrices, nous avons démontré que l'activation du récepteur survenait par des mécanismes alternatifs aux mutations dans une large majorité de cas et participerait à l'initiation de la maladie. En revanche, nous n'avons pas pu prouver l'implication de ce récepteur dans la progression de la maladie ou dans sa réponse au traitement. Il semble que la régulation de ALK soit complexe et le rôle exact de ce récepteur dans la progression du neuroblastome reste à établir. En revanche, nous avons démontré l'importance du ligand MDK dans la régulation de l'expression et de l'activation de ALK ainsi que dans le contrôle de la survie des cellules neuroblastiques. Inhiber cette cytokine représente une stratégie thérapeutique intéressante, complémentaire des thérapies anti-ALK, actuellement en développement clinique dans le neuroblastome. D'autre part, la caractérisation phénotypique du modèle a permis de mettre en évidence une signalisation altérée des dommages à l'ADN associée à une instabilité génétique accrue dans les tumeurs résistantes. Celles-ci présentent également une modification de progression dans le cycle cellulaire et une proportion plus importante de cellules quiescentes. Au final, ce travail a permis d'identifier différents mécanismes de résistance qui représentent des marqueurs de réponse au traitement et des cibles thérapeutiques intéressantes dans le neuroblastome.

**MOTS-CLES** : neuroblastome, topoisomérase I, CPT-11, résistance, Anaplastique Lymphoma Kinase, Midkine, instabilité génétique, cycle cellulaire, quiescence.

**ADRESSE DU LABORATOIRE** : UMR8203 « Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses », Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94 805 Villejuif cedex, France

Frais de reprographie pris en charge par la taxe d'apprentissage collectée par l'IGR