



HAL
open science

Les gènes TWIST : cibles transcriptionnelles des gènes MYC dans le neuroblastome

Abdelkader Selmi

► **To cite this version:**

Abdelkader Selmi. Les gènes TWIST : cibles transcriptionnelles des gènes MYC dans le neuroblastome. Biologie cellulaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT: . tel-00535535v1

HAL Id: tel-00535535

<https://theses.hal.science/tel-00535535v1>

Submitted on 11 Nov 2010 (v1), last revised 29 Mar 2011 (v2)

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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
Délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE MOLECULAIRE INTEGRATIVE & CELLULAIRE

DIPLOME DE DOCTORAT
(Arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le jeudi 10 décembre 2009

Par
M. SELMI Abdelkader

Les gènes *TWIST* : cibles transcriptionnelles
des gènes *MYC* dans le neuroblastome

Directrice de thèse : Dr Sandrine WITTMANN

Jury :
Pr Germain GILLET (président du jury)
Dr Sétha DOUC-RASY (rapporteuse)
Pr François BERGER (rapporteur)
Dr Sandrine WITTMANN (directrice de thèse)

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
Délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE MOLECULAIRE INTEGRATIVE & CELLULAIRE

DIPLOME DE DOCTORAT
(Arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le jeudi 10 décembre 2009

Par
M. SELMI Abdelkader

Les gènes *TWIST* : cibles transcriptionnelles
des gènes *MYC* dans le neuroblastome

Directrice de thèse : Dr Sandrine WITTMANN

Jury :
Pr Germain GILLET (président du jury)
Dr Sétha DOUC-RASY (rapporteuse)
Pr François BERGER (rapporteur)
Dr Sandrine WITTMANN (directrice de thèse)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. le Professeur L. Collet

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur J-F. Mornex

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur G. Annat

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur D. Simon

Secrétaire Général

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. Le Professeur F. Gieres

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Institut Universitaire de Technologie A

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Institut Universitaire de Technologie B

Directeur : M. le Professeur R. Lamartine

Institut de Science Financière et d'Assurance

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M R. Bernard

RESUME

Résumé

Dans les neuroblastomes, le gène *N-MYC* est amplifié dans 20-25 % des cas, associé à un mauvais pronostic. Au laboratoire, nous avons préalablement montré que la dérégulation de l'expression du gène *TWIST1* était corrélée à celle de *N-MYC* dans les neuroblastomes agressifs de stade IV avec une amplification de *N-MYC* (Valsesia-Wittmann et al., 2004). Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence que les gènes *TWIST1* et *TWIST2* étaient régulés positivement ou négativement de façon dose dépendante par les oncoprotéines Myc. De façon intéressante, le maintien de l'expression de *TWIST1* est dépendant de l'expression des protéines Myc. Ces résultats suggèrent que la dérégulation et l'amplification des oncoprotéines Myc dans les neuroblastomes *N-MYC* Amplifiés pourraient permettre l'induction sélective et le maintien de l'expression de l'oncogène *TWIST*, agissant comme facteur de survie.

Title

***TWIST* genes: transcriptional targets of *N-MYC* and *c-MYC* in neuroblastoma**

Abstract

The *N-MYC* gene is amplified in 20-25 % of human neuroblastoma, and this amplification is associated with poor clinical outcome. We previously reported a constant deregulation of *TWIST1* in synergy with *N-MYC* in aggressive stage IV neuroblastoma harboring *N-MYC* amplification (Valsesia-Wittmann *et al.*, 2004). We demonstrated here that specifically in neuroblastoma cells, *TWIST1* and *TWIST2* are negatively or positively regulated depending on Myc oncoproteins dosage, thus being a putative Myc transcriptional target. We confirmed by EMSA that Myc proteins could bind *TWIST1* promoter. We further highlighted *TWIST1* maintenance of expression strictly Myc dependant. Therefore, we propose that deregulation and amplification of Myc oncoproteins in aggressive neuroblastoma tumors induce selective expression and maintenance of *TWIST1* oncogene, responsible for apoptosis resistance.

Mots clés

Neuroblastome, *N-MYC*, *c-MYC*, *TWIST1*, *TWIST2*, *DERMO1*, *ADAS*, apoptose, *E-box*, cancer, tumorigénèse

Key words

Neuroblastoma, *N-MYC*, *c-MYC*, *TWIST1*, *TWIST2*, *DERMO1*, *ADAS*, apoptosis, *E-box*, cancer, tumorigenesis

Discipline :

Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

ONCOGENESE & PROGRESSION TUMORALE, Unité INSERM/UCBL U590
Centre Léon Bérard, 28 rue Laënnec, 69373 LYON CEDEX 08

REMERCIEMENTS

Je remercie le Pr Germain Gillet, le Pr François Berger et le Dr Sétha Douc-Rasy, membres du jury, pour avoir accepté de juger mon travail. Je remercie plus particulièrement mes deux rapporteurs, le Dr Sétha Douc-Rasy et le Pr François Berger.

Je remercie le Dr Jean Bénard et le Dr Mard Billaud membres de mon comité de thèse, pour leurs conseils avisés et pour avoir assuré le suivi de ma thèse.

Je remercie le Pr Alain Puisieux, directeur de l'unité INSERM U590, co-responsable de l'équipe « inactivation fonctionnelle de p53 », et directeur de ma thèse en 1^{ère} année, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire depuis mon M2 et pour m'avoir permis de mener mes travaux de recherche.

Je remercie ma directrice de thèse, le Docteur Sandrine Wittmann, pour son encadrement technique et scientifique ainsi que son soutien.

Je remercie Anne-Catherine Jallas et Elisabeth Garin, techniciennes du laboratoire avec qui j'ai travaillé pendant ces quatre années, pour leur aide technique et leur soutien.

Je remercie Virginie Belin, technicienne, et Julie Putelat, la stagiaire que j'ai co-encadrée, qui ont partagé notre quotidien au laboratoire et qui sont aujourd'hui des amies.

Je remercie le Dr Véronique Maguer-Satta et les membres de son équipe pour la collaboration scientifique autour du projet des ADAS.

Je remercie Stéphane Ansieau et Laurent Bartholin CR INSERM pour les échanges scientifiques et leurs conseils.

REMERCIEMENTS

Je remercie et souhaite une bonne continuation aux étudiants du laboratoire, anciens et actuels pour les discussions scientifiques et techniques mais aussi pour leur sympathie et la bonne ambiance au laboratoire. Je pense en particulier à Elodie Bachelard-Cascalès, Houda Boukhebza, Amandine Chatagnon, Ghassan Hamdan, Laury Perriaud, Vanja Sisirak, Clémence Thomas, Linda Zane et aux docteurs Benjamin Bouchet, Mickaël Gobert, Gaël Grelier et Delphine Perrin.

Je remercie mes amis de la Croix-Rousse et militants pour tous ces moments conviviaux et instructifs qui permettent de prendre le recul nécessaire. Je remercie également mes ex-colocs, en particulier Christine pour la rélecture de ma thèse et ses corrections.

Je remercie Elodie Szturemski pour m'avoir supporté et soutenu et tout particulièrement ces derniers mois alors qu'elle préparait son concours. Bonne chance !

Je remercie ma mère pour son soutien et j'ai une pensée pour mon père décédé qui j'espère aurait été fier de moi.

Enfin, je remercie la Ligue Nationale contre le Cancer et à travers elle les bénévoles et les donateurs de cette association pour m'avoir accordé un financement pour ma thèse.

TABLE DES MATIERES

RESUME	IV
REMERCIEMENTS	V
TABLE DES MATIERES	VII
LISTE DES ILLUSTRATIONS	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
ABREVIATIONS.....	1
I. INTRODUCTION	4
II. GENERALITES.....	6
A. LE NEUROBLASTOME : UN MODELE DE DEVELOPPEMENT TUMORAL	6
1. <i>Le neuroblastome</i>	6
a) Origine	6
b) Localisation	10
c) Cellules souches cancéreuses du neuroblastome.....	11
d) Classification du neuroblastome.....	14
e) Neuroblastomes familiaux	17
2. <i>Famille p53/p63/p73</i>	18
3. <i>Biologie du neuroblastome</i>	21
a) Pléidie.....	21
b) Anomalies cytogénétiques	22
(1) Gain du chromosome 17	22
(2) Perte du chromosome 1	23
(3) Perte du chromosome 11	23
(4) Perte du chromosome 14.....	24
(5) Autres chromosomes	24
c) Dérégulation de <i>N-MYC</i>	24
(1) Amplification de N-MYC	25
(2) Simple Copie pour N-MYC	26
(3) N-MYC principal oncogène du neuroblastome.....	27
d) <i>MDM2</i> & <i>CASP8</i>	27
e) Récepteurs neurotrophiques	28
(1) p75NTR.....	28
(2) TrkA.....	29
(3) TrkB.....	30
(4) TrkC.....	30
f) Récepteurs à dépendance.....	31
4. <i>Caractérisation du transcriptome et de l'épigénome des tumeurs de neuroblastome</i>	31
5. <i>Dépistage et prise en charge</i>	33
a) Dépistage	33
b) Traitements	33
B. LA FAMILLE MYC.....	35
1. <i>Les gènes MYC et leur structure</i>	35
a) <i>c-MYC</i>	35
b) <i>N-MYC</i>	35

TABLE DES MATIERES

c) <i>L-MYC</i>	35
d) Structure des protéines Myc.....	36
e) <i>B-MYC</i> et <i>S-MYC</i> : les deux petits derniers.....	37
2. <i>Expression et régulation des gènes MYC</i>	38
a) Profils d'expression des gènes <i>MYC</i>	38
(1) Développement embryonnaire	38
(2) Chez l'adulte	40
b) Régulation de l'expression des gènes <i>MYC</i>	40
3. <i>Les gènes MYC : propriétés et fonctions</i>	42
a) Facteurs de transcription	42
(1) Le couple Myc-Max au cœur du réseau Myc/Mad/Max.....	42
(2) Répresseur transcriptionnel via Miz1	44
(3) Gènes cibles des protéines Myc	45
(4) Les microARN, de nouvelles cibles des protéines Myc	45
b) Inducteurs de la croissance et du cycle cellulaire	47
c) Inducteurs de l'apoptose.....	48
d) Acteurs du développement	49
e) Inhibiteurs de la différenciation	51
f) Les gènes <i>MYC</i> et les cellules souches	51
4. <i>Les gènes MYC : des oncogènes universels</i>	52
C. LA FAMILLE TWIST	56
1. <i>Les gènes TWIST</i>	56
a) Structure	56
b) Les gènes <i>TWIST</i> chez les autres espèces	58
c) De nouveaux membres dans la famille <i>TWIST</i>	59
2. <i>Profils d'expression</i>	59
a) Embryogénèse	59
b) Adulte.....	61
3. <i>Fonctions et Invalidation</i>	61
a) Invalidation partielle ou totale des gènes <i>TWIST</i>	61
b) Système immunitaire	63
c) Derme	64
d) Ostéogénèse	64
e) Myogénèse.....	65
f) EMT	66
g) Apoptose.....	67
h) microARN	68
i) Cellules souches.....	69
4. <i>Syndromes et cancers</i>	70
a) Syndromes	70
b) Cancer	70
III. BASES RATIONNELLES.....	77
IV. OBJECTIFS	79
V. RESULTATS	82
A. COOPERATION ONCOGENIQUE ENTRE MYC ET TWIST	82
1. <i>Dérégulation de l'expression des gènes MYC et TWIST dans le neuroblastome</i>	82

TABLE DES MATIERES

a) Lignées de neuroblastome	82
b) Tumeurs de neuroblastome.....	85
2. <i>Dérégulation de l'expression des gènes MYC et TWIST dans les cancers du colon et du sein</i>	88
3. <i>Modulation de l'expression des gènes MYC</i>	90
a) Effets de la surexpression des gènes <i>MYC</i> sur l'expression des gènes <i>TWIST</i> dans le neuroblastome	90
b) Effets de l'inhibition de l'expression de <i>N-MYC</i> sur l'expression des gènes <i>TWIST</i> dans le neuroblastome	93
4. <i>Fixation des protéines Myc sur les boîtes E de TWIST1</i>	96
5. <i>Activation du promoteur TWIST1 par les protéines Myc</i>	99
B. MODELE DE PROGRESSION TUMORALE	103
1. <i>Extraction des cellules ADAS</i>	103
2. <i>Caractérisation phénotypique des cellules ADAS</i>	104
3. <i>Différenciation des cellules ADAS</i>	107
4. <i>Transfection des cellules ADAS</i>	109
5. <i>Analyse de la chimiosensibilité des cellules ADAS</i>	110
VI. DISCUSSION	114
VII. CONCLUSION & PERSPECTIVES	121
VIII. MATERIEL & METHODES	125
A. CULTURE CELLULAIRE	125
1. <i>Lignées</i>	125
2. <i>Cellules ADAS</i>	126
3. <i>Transfection cellulaire</i>	127
4. <i>Interférence ARN</i>	128
B. PLASMIDES ET CONSTRUCTIONS.....	128
1. <i>Plasmides pour la culture cellulaire</i>	128
2. <i>Constructions pGL3</i>	129
C. EXTRACTION ARN & PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL	129
D. TESTS LUCIFERASE	132
E. GELS RETARD	132
F. CYTOMETRIE EN FLUX	133
G. PROTOCOLES DE DIFFERENCIATION	133
1. <i>Culture 2D et 3D</i>	133
2. <i>Différenciation neurale</i>	134
H. TEST DE TOXICITE.....	134
IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	137
ANNEXES : PUBLICATIONS	178
EN PREPARATION	178
PUBLIEE.....	200

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Neurulation	7
Figure 2 : Différenciation des cellules des crêtes neurales.....	8
Figure 3 : Localisation des neuroblastomes	10
Figure 4 : Théorie de la Cellule Souche Cancéreuse.....	13
Figure 5 : Modèle d'évolution du neuroblastome	17
Figure 6 : Isoformes de la protéine p73.....	19
Figure 7 : Boucles de rétrocontrôle p53/p73	20
Figure 8 : Ratio entre les isoformes Δ Np73 et TAp73.....	20
Figure 9 : Protéines Myc humaines	36
Figure 10 : Protéines B-Myc et S-Myc.....	37
Figure 11 : Structure des couples Myc-Max et Mad-Max sur les boîtes E	43
Figure 12 : Régulation transcriptionnelle par Myc/Mad/Max.....	44
Figure 13 : Répression transcriptionnelle via Miz1	45
Figure 14 : Les protéines Myc induisent la prolifération cellulaire.....	48
Figure 15 : Induction de l'apoptose par Myc	49
Figure 16 : <i>MYC</i> , un oncogène multifonction	54
Figure 17 : Les protéines Twist1 et Twist2 chez l'Homme	57
Figure 18 : Transition épithélio-mésenchymateuse	67
Figure 19 : Expression des gènes <i>MYC</i> & <i>TWIST</i> (RT-PCR quantitative) dans les lignées de neuroblastome	83
Figure 20 : Expression des gènes <i>MYC</i> & <i>TWIST</i> (RT-PCR quantitative) dans des tumeurs de neuroblastome	86
Figure 21 : Expression des gènes <i>MYC</i> & <i>TWIST</i> par RT-PCR quantitative dans les cancers du colon et du sein.....	89
Figure 22 : Analyse par RT-PCR quantitative des effets de la surexpression ectopique des gènes <i>MYC</i> dans les cellules SHEP	91
Figure 23 : Analyse par RT-PCR quantitative de cinétiques d'induction de <i>N-MYC</i> dans les cellules TET21N	92
Figure 24 : Analyse par RT-PCR quantitative de l'inhibition de l'expression de <i>N-MYC</i> dans les cellules WAC.....	94

Figure 25 : Analyse par RT-PCR quantitative de cinétiques de répression de <i>N-MYC</i> dans les cellules TET21N	95
Figure 26 : Promoteur du gène <i>TWIST1</i>	96
Figure 27 : Gels retard.....	98
Figure 28 : Constructions pGL3.....	99
Figure 29 : Tests luciférase	100
Figure 30 : Photos de sphères de cellules ADAS	104
Figure 31 : Profil d'expression des cellules ADAS	106
Figure 32 : Tests de différenciation en culture 2D et 3D	107
Figure 33 : Immunofluorescence après test de différenciation neurale.....	108
Figure 34 : Sphères transfectées avec la GFP.....	109
Figure 35 : Tests de sensibilité aux drogues	111
Figure 36 : Transformation tumorale : différences entre tumeurs pédiatriques embryonnaires et tumeurs solides adultes	119
Figure 37 : Extraction de cellules ADAS.....	126

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification d'Evans	14
Tableau 2 : Classification INSS	15
Tableau 3 : Classification de risque IRGS.....	16
Tableau 4 : Profil d'expression des gènes <i>MYC</i>	39
Tableau 5 : Oncogènes <i>MYC</i> dans les cancers.....	53
Tableau 6 : Dérégulation et rôles de l'oncogène <i>TWIST1</i> dans les cancers.....	72
Tableau 7 : Dérégulation de l'expression des gènes <i>MYC</i> & <i>TWIST</i> dans les lignées de neuroblastome	84
Tableau 8 : Dérégulation de l'expression des gènes <i>MYC</i> & <i>TWIST</i> dans des tumeurs de neuroblastome	87
Tableau 9 : Phénotype des ADAS par cytométrie en flux	105
Tableau 10 : Amorces de RT-PCR quantitative	130

ABREVIATIONS

2D	2 dimensions
3D	3 dimensions
aa	Acide(s) Aminé(s)
Ac	Anticorps
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARF	Alternate Reading Frame
ARN / RNA	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATCC	American Type Culture Collection
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bHLH	basic HLH
BSA	Bovine Serum Albumin
CASP8	Caspase 8
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
Cp	Crossing Point
CSC	Cellule Souche Cancéreuse
DM	Double Minute
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
GFP	Green Fluorescent Protein
HDAC	Histone Deacetylase
HAT	Histone Acetyltransferase
HLH	Helix-Loop-Helix
HSR	Homogeneously Staining Region
INR	Initiator element
INSS	International neuroblastoma Staging System
iPS	induce Pluripotent Stem cell
IRES	Internal Ribosomal Entry Sequence
IRGS	International Risk Grouping System
Kb	kilobase
kDa	kilodalton
KO	Knock-Out
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
LNGFR	Low affinity NGF Receptor
LZ	Leucine Zipper
MAX	Myc Associated factor X
MB	Myc Box
MDM2	Mouse Double Minute 2 homolog
MDR	Multi Drug Resistance
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
Miz	Msx-Interacting Zing finger
MSC	Mesenchymal Stem Cell
<i>MYC</i>	Myelocytomatosis viral oncogen homolog (avian)
<i>N-MYC</i>	Neuroblastoma- <i>MYC</i>
NB	Neuroblastome

ABREVIATIONS

NGF	Nerve Growth Factor
NMA	<i>N-MYC</i> amplifié
NT3	Neurotrophine 3
NT4	Neurotrophine 4
ODC	Ornithin Decarboxylase
p75NTR	p75 Neurotrophin Receptor
Parc	p53-associated Parkin-like cytoplasmique protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT	Reverse Transcription
RT-PCR	Real Time-PCR
SC	Simple Copie
siRNA	short interfering RNA
SNC	Système Nerveux Central
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TAp73	Trans-Activated p73
TIC	Tumor Initiating Cell
TNF	Tumor necrosis factor
TP53	Tumor Protein p53
TP73	Tumor Protein p73
Trk	Tropomyosine Related Kinase (A, B et C)

**INTRODUCTION
&
GENERALITES**

I. INTRODUCTION

Le neuroblastome est une tumeur embryonnaire qui affecte l'enfant très jeune, généralement âgé de moins de cinq ans. Il représente la tumeur solide extra-crânienne la plus fréquente du jeune enfant. Cette tumeur dérive des précurseurs du système sympathique périphérique et siège à ses différents étages : cervical, thoracique, abdominal ou surrénalien (forme majoritaire). Remarquable par son hétérogénéité de présentation et d'évolution, les tumeurs neuroblastiques forment un spectre de malignité extrêmement large allant des formes les plus agressives mais également les plus fréquentes à celles plus rares présentant une régression spontanée. On distingue les formes de présentation clinique favorables des formes défavorables lors du diagnostic clinique. Les formes les plus agressives, ou neuroblastome à haut risque, sont constituées des formes métastatiques (stades 4) de l'enfant de plus de 12 mois ainsi que les neuroblastomes *N-MYC* amplifiés quelque soit le stade (25 à 30 % tous stades confondus). L'amplification de l'oncogène *N-MYC* pour les tumeurs est un élément crucial pour le choix thérapeutique : une forme cliniquement favorable d'emblée devient un neuroblastome à haut risque si la tumeur est amplifiée pour *N-MYC*. Les neuroblastomes à haut risque (plus de 50 % des cas) présentent un taux de survie à cinq ans de moins de 30 % en dépit de traitements extrêmement lourds : chimiothérapie d'induction, chirurgie de la tumeur primitive, chimiothérapie à haute dose avec secours hématologique, suivi d'un traitement d'entretien incluant chimiothérapie et acide rétinoïque.

L'hétérogénéité clinique et biologique de cette tumeur embryonnaire et sa survenue précoce dans la vie conduisent à considérer le neuroblastome comme un modèle d'étude développement - cancer et à rechercher les mécanismes oncogéniques sous-tendant la transformation tumorale de cellules embryonnaires.

Comme d'autres oncogènes, le gène *N-MYC* présente une dualité fonctionnelle puisqu'il est capable à la fois d'induire la prolifération cellulaire mais également l'apoptose. Pour induire la transformation cellulaire, *N-MYC* doit coopérer avec un autre oncogène. Dans le cas du neuroblastome, il a été décrit que *N-MYC* pouvait coopérer avec plusieurs gènes dont *MDM2* ou *TWIST1*. Ce dernier

peut inhiber l'apoptose induite par *N-MYC* complétant ainsi les propriétés oncogéniques de *N-MYC*. D'autre part, les gènes *N-MYC* et *TWIST1* participant au développement du système nerveux périphérique, l'étude de leur interaction fonctionnelle peut conduire à la compréhension d'un mécanisme fondamental de l'oncogenèse du neuroblastome.

Durant ma thèse, je me suis intéressé à la coopération oncogénique entre les deux familles des gènes *MYC* (*c-MYC* et *N-MYC*) et *TWIST* (*TWIST1* et *TWIST2*). Le lien entre les gènes *N-MYC* et *TWIST1* a été plus particulièrement au centre de mes travaux.

Dans un premier temps nous exposerons les **Généralités** relatives au neuroblastome ainsi qu'aux familles des gènes *MYC* et *TWIST*. Puis nous présenterons les **Bases Rationnelles** du travail fondées sur l'implication des gènes *MYC* et *TWIST* dans le développement du système nerveux sympathique nous conduisant à poser les **Questions** et formuler les **Objectifs** de la thèse. Enfin, les **Résultats** de nos travaux, suggérant que les gènes *TWIST* sont des cibles transcriptionnelles des gènes *MYC*, seront suivis de la **Discussion** et des **Perspectives**.

II. GENERALITES

A. Le neuroblastome : un modèle de développement tumoral

1. Le neuroblastome

Le neuroblastome représente 8 à 10 % de toutes les tumeurs de l'enfant (Westermann and Schwab, 2002). C'est le 3^{ème} cancer pédiatrique le plus répandu et la tumeur solide extra-cérébrale la plus fréquente parmi les cancers pédiatriques (Matthay, 1995;Gurney et al., 1997). L'incidence annuelle est d'un nouveau cas pour 7000 naissances. Le neuroblastome est responsable de 15 % des décès par cancer chez l'enfant : 60 à 70 % des patients présentant un stade avancé meurent à cause de la progression tumorale (Gurney *et al.*, 1997). Ce cancer affecte plus particulièrement les jeunes enfants et nourrissons (moins de 12 mois) : 60 % des enfants atteints ont moins de 2 ans et 96 % moins de 10 ans (Grovas et al., 1997). La survenue précoce dans la vie de ce cancer pédiatrique et d'autres arguments, présentés par la suite, conduisent à considérer le neuroblastome comme une maladie du développement embryonnaire.

a) Origine

Le neuroblastome est issu des neuroblastes qui sont des cellules embryonnaires participant à la formation des glandes surrénales et du système nerveux périphérique (SNP). Les neuroblastes sont dérivés des cellules des crêtes neurales qui se forment au cours du développement embryonnaire pendant le processus de neurulation.

A la fin de la gastrulation, dans la partie dorsale de l'embryon, se déroule la neurulation qui correspond à la formation du tube neurale et à l'initiation du développement du système nerveux. Au cours de cette étape, la partie dorsale de l'ectoderme forme la plaque neurale qui, par invagination, permet ensuite la mise en place du tube neural [Figure 1]. Ces deux étapes cruciales sont induites par les facteurs de signalisation moléculaires des familles *WNT*, *FGF* et *BMP* qui sont exprimés par le mésoderme et l'ectoderme non-neural environnant (LaBonne and

Bronner-Fraser, 1998;Meulemans and Bronner-Fraser, 2004;Steventon et al., 2005;Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2006;Raible, 2006).

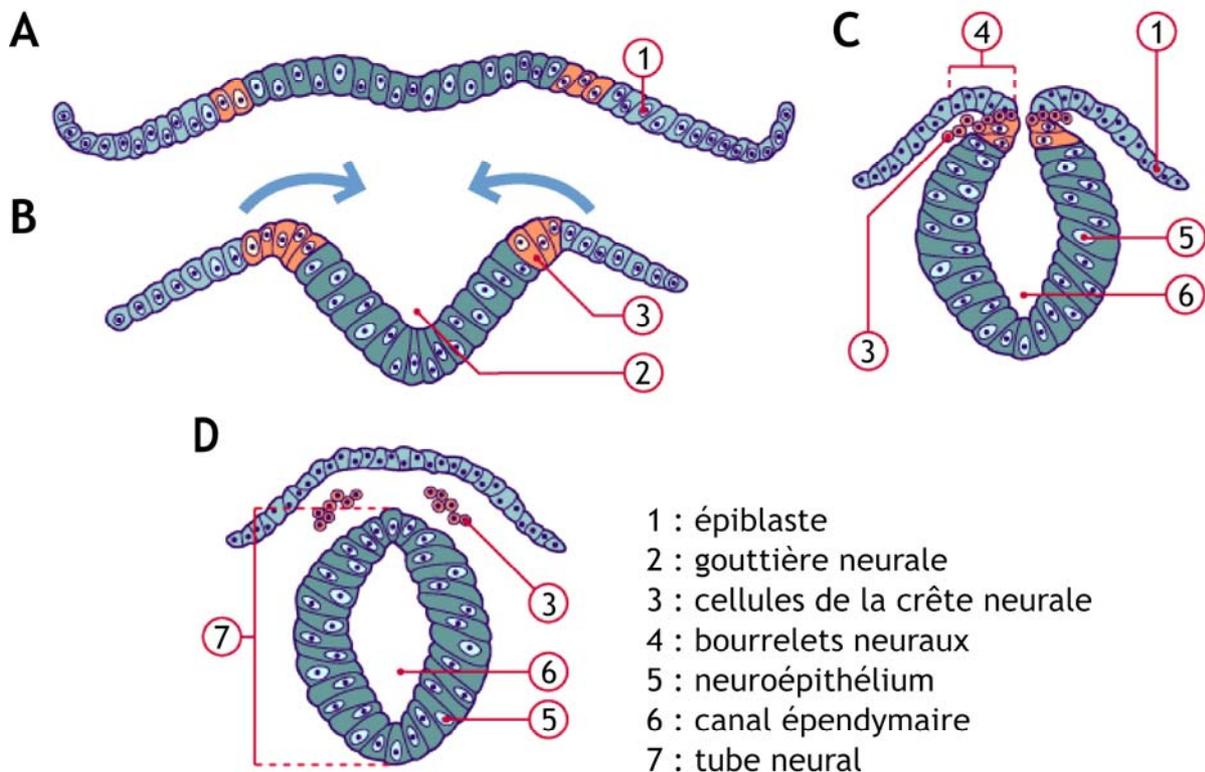


Figure 1 : Neurulation

Au cours de la neurulation, l'ectoderme dorsal s'épaissit pour former (A) la plaque neurale qui s'invagine pour donner (B) la gouttière neurale dont (C) la fermeture aboutit au (D) tube neural.

Les cellules situées dans la partie dorsale du tube neural (jonction ectoderme - neur ectoderme) se dissocient du neuroépithélium grâce à la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (EMT) pour former les crêtes neurales [Figure 1] (Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2006). Cette EMT est induite par l'expression des marqueurs des crêtes neurales *SNAIL/SLUG*, *FOXD3*, *SOX10*, *SOX9* et *c-MYC* puis *TWIST* et *ID* (nous verrons par la suite l'implication des gènes *TWIST* dans l'EMT) (Martinsen and Bronner-Fraser, 1998;LaBonne and Bronner-Fraser, 2000;Sasai et al., 2001;Spokony et al., 2002;Aoki et al., 2003;Bellmeyer et al., 2003;Honore et al., 2003;Ishii et al., 2003;Meulemans et al., 2003;Meulemans and Bronner-Fraser, 2004;Steventon et al., 2005).

Les cellules des crêtes neurales migrent ensuite pour rejoindre différentes régions de l'embryon où elles se différencient en un grand nombre de structures [Figure 2] (Dupin et al., 2007) :

- neurones des ganglions sensitifs des nerfs spinaux (rachidiens et crâniens)
- neurones des ganglions sensitifs du système nerveux autonome (sympathique, parasympathique)
- celles satellites et cellules de Schwann du SNP
- leptoméninges (pie-mère et arachnoïde)
- mélanocytes
- dents, squelette, muscles de la face
- paroi vasculaire des arcs aortiques, septum cardiaque, valvules semi-lunaires
- cellules de la médullosurrénale
- cellules neuroendocrines des voies digestives et respiratoires
- cellules parafolliculaires de la thyroïde, sécrétrices de calcitonine.

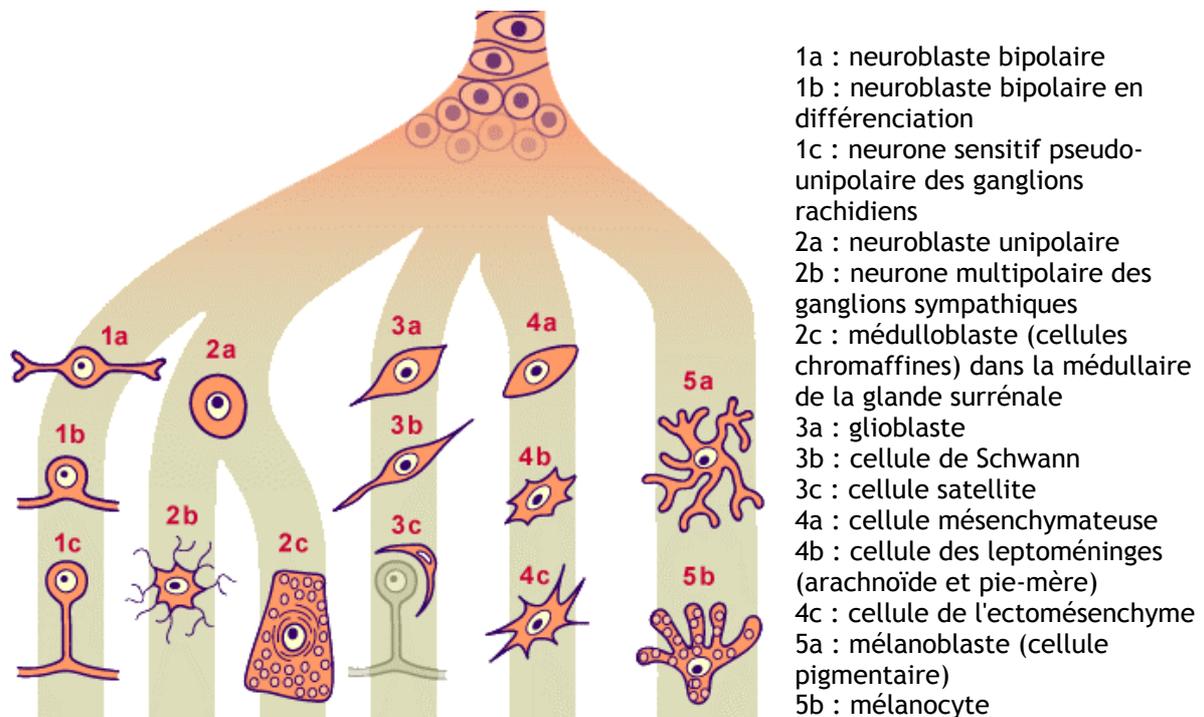


Figure 2 : Différenciation des cellules des crêtes neurales

Les neuroblastes, dont proviennent les neuroblastomes, sont des cellules intermédiaires de la différenciation des cellules des crêtes neurales. Ce sont des cellules progénitrices en cours de différenciation et de migration à l'origine des médulloblastes (médullosurrénales), des neurones multipolaires (ganglions sympathiques) et des neurones sensitifs pseudo-unipolaires (ganglions rachidiens) [1a et 2a Figure 2].

La différenciation des cellules des crêtes neurales s'opère en deux temps puisqu'elle a d'abord lieu dans la partie antérieure de l'embryon (crête neurale céphalique), puis dans les autres régions (crête neurale spinale).

Les cellules de la crête neurale céphalique forment deux populations cellulaires : d'une part des cellules à potentiel neuronal et d'autre part des cellules à vocation ecto-mésenchymateuse. La première population permet la formation des ganglions sensitifs et parasympathiques des nerfs crâniens (V, VII, IX et X). La seconde est issue d'une différenciation mésenchymateuse de cellules neuroblastiques. Elle participe au développement de la glie (cellules satellites et de Schwann) ainsi que de nombreuses autres structures (cartilage des os du nez, oreille moyenne, derme et muscles de la face...).

Les cellules de la crête neurale spinale sont notamment à l'origine de cellules ou structures neuronales (ganglions de la racine dorsale et ganglions parasympathiques entériques) et non-neuronales, telles que les cellules gliales (cellules de Schwann), les cellules neurosécrétrices chromaffines de la médullosurrénale et les mélanocytes.

Par ailleurs, lors du développement du système nerveux périphérique (SNP) le gène *N-MYC* joue un rôle prépondérant. Il a été observé qu'un taux d'expression élevé de *N-MYC* induisait la prolifération, la migration et l'activation du cycle cellulaire des neuroblastes tandis qu'une faible expression était associée à une différenciation terminale en neurone (Wakamatsu et al., 1997).

Les neuroblastes malins, au phénotype fréquemment peu différencié ou indifférencié, sont capables de proliférer et de migrer. De plus, l'amplification du gène *N-MYC* concerne environ 30 % des cas.

Comme nous venons de le voir, les gènes *MYC* et *TWIST* sont impliqués dans le développement normal des neuroblastes. Par ailleurs, il est intéressant de constater le « double-jeu » des gènes *N-MYC* et *TWIST* en particulier qui, comme nous le verrons par la suite, sont des gènes indispensables au développement embryonnaire normal. Au-delà du développement, *N-MYC* et *TWIST* sont de puissants oncogènes dont la surexpression ou l'amplification est corrélée à un

mauvais pronostic des cancers. Ces arguments étayent la pertinence de nos travaux consacrés d'une part à l'étude de la dérégulation de ces gènes dans le neuroblastome, et d'autre part, à l'obtention d'un modèle biologique permettant l'analyse du rôle de ces gènes dans le processus tumoral.

b) Localisation

Le neuroblastome est issu des cellules embryonnaires dérivées de la crête neurale et destinées aux glandes surrénales et au système nerveux sympathique. La localisation des neuroblastomes est variable [Figure 3]. Le neuroblastome peut survenir tout le long du système nerveux sympathique. Et, dans la majorité des cas (65 %), la tumeur primaire est abdominale dont 35 % des neuroblastomes totaux dans la médullosurrénale (Maris and Matthay, 1999).

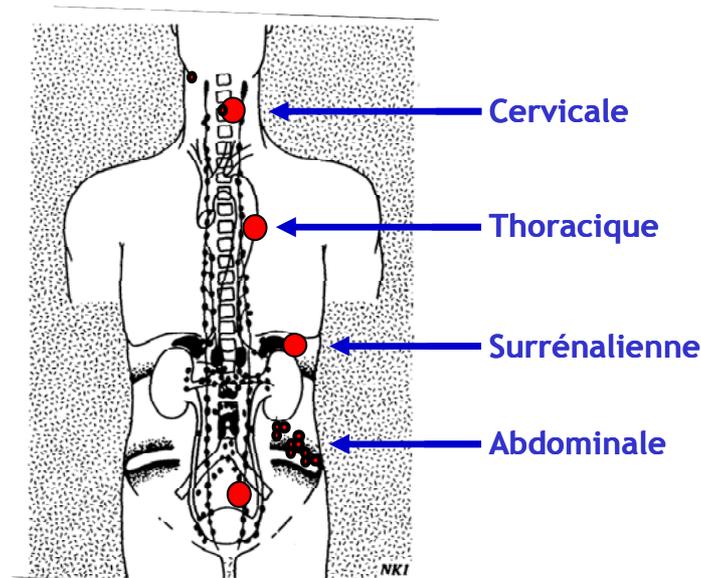


Figure 3 : Localisation des neuroblastomes

Au diagnostic, la présence de métastases concerne 60 % des cas. Elles se retrouvent préférentiellement au niveau de la moelle osseuse et de l'os. Mais elles peuvent également se développer au niveau des ganglions lymphatiques, du foie, de la peau et lors des phases terminales dans les poumons et le cerveau.

La principale caractéristique du neuroblastome est son hétérogénéité clinique. Le comportement biologique du neuroblastome est aussi extrêmement variable et par certains aspects unique puisque les tumeurs peuvent (i)

spontanément régresser ou (ii) se différencier ou (iii) progresser rapidement et provoquer le décès du patient.

Pour le neuroblastome, la régression spontanée a une incidence de 10 à 100 fois plus importante que les autres cancers (Pritchard and Hickman, 1994). Elle peut être observée chez certains nourrissons mais également chez des patients plus âgés (Fiorillo et al., 1982;Eklof et al., 1983).

La maturation des tumeurs de neuroblastome en ganglioneurome bénin est moins fréquente et est généralement observée après une chimiothérapie (Berthold and Hero, 2000).

Enfin, la majorité des patients (60 %) présente des métastases dès le diagnostic, la présence de celles-ci est associée à une progression rapide et à un faible taux de survie, 25 à 30 % à 5 ans, malgré les traitements (Westermann and Schwab, 2002).

c) Cellules souches cancéreuses du neuroblastome

Le neuroblastome est issu de la transformation tumorale de neuroblastes dérivés des crêtes neurales. Tout comme les neuroblastes normaux, les neuroblastes malins peuvent se différencier en cellules neuronales et ce notamment après un traitement à l'acide rétinoïque (Sidell, 1982;Chu et al., 2003;Brown et al., 2005;Hahn et al., 2008). A partir de ces éléments, différents groupes se sont intéressés aux propriétés « souches » des cellules tumorales de neuroblastome.

Ainsi, il a été montré que le facteur des cellules souches SCF (*Stem Cell Factor*) était exprimé par certaines tumeurs de neuroblastome (Beck et al., 1995;Cohen et al., 1994). Il a été suggéré par la suite que l'expression du SCF dans ces tumeurs pourrait intervenir dans la protection contre l'apoptose (Timeus et al., 1997). Néanmoins, l'expression du SCF était décrite comme faible et rarement accompagnée de son récepteur c-Kit (Beck et al., 1995).

En parallèle, l'observation de lignées de neuroblastome a permis de distinguer différents types de cellules tumorales : Neuroblastique (N), Schwannien

(S) et plus récemment Intermédiaire (I) (Biedler et al., 1973a; Ross et al., 1983; Ciccarone et al., 1989; Ross et al., 1995; Ross et al., 2003).

Les cellules de type N (neuroblastique ou neuroendocrine) présentent une morphologie de neuroblastes immatures avec un petit corps cellulaire réfractant, un rapport noyau-cytoplasme élevé et des neurites courts. Ces cellules ont une meilleure adhérence entre elles que sur le support de culture (Biedler et al., 1973a; Ross et al., 1983; Ciccarone et al., 1989).

Les cellules de type S (schwannien) sont de grandes cellules plates avec un noyau ovale et un rapport noyau-cytoplasme faible. Elles ont une morphologie non-neuronale et mélanoblastique. Contrairement aux cellules de type N, elles sont fortement adhérentes au support de culture et ne possèdent aucun processus neural (Biedler et al., 1973a; Ross et al., 1983; Ciccarone et al., 1989).

Les cellules de type I (intermédiaire), comme leur nom l'indique, présentent un phénotype intermédiaire entre les types N et S. Elles présentent un noyau rond et proéminent. Ces cellules de type I sont capables de se différencier en cellules de type N ou S (Ross et al., 1995; Ross et al., 2003). Ces cellules I sont les seules des trois types I, N et S à exprimer le marqueur de cellules souches c-Kit (Walton et al., 2004). De plus, leur capacité à exclure en partie le colorant Hoescht les classant en side-population (SP) atteste de leur phénotype immature voire souche (Hirschmann-Jax et al., 2004).

Cette capacité de différenciation d'un type à l'autre, lié à leur état immature a conduit à suggérer que ces cellules de type I pourraient correspondre à des cellules souches cancéreuses de la crête neurale (Ross et al., 1995). Ces résultats sont confortés par des données de tumorigénicité in vivo dans lesquelles ces cellules de type I apparaissent plus tumorigènes et plus malignes que les N ou S (Spengler et al., 1997; Ross et al., 2003).

Dès lors, le neuroblastome a été considéré comme un modèle pertinent pour la mise en évidence de cellules souches cancéreuses (CSC) et l'identification de leur implication dans la progression tumorale. Ces cellules souches cancéreuses possèderaient trois principales propriétés (auto-renouvellement, différenciation et chimiorésistance) qui leur permettraient de former une tumeur ou une rechute à partir d'une seule CSC (Pardal et al., 2003) [Figure 4].

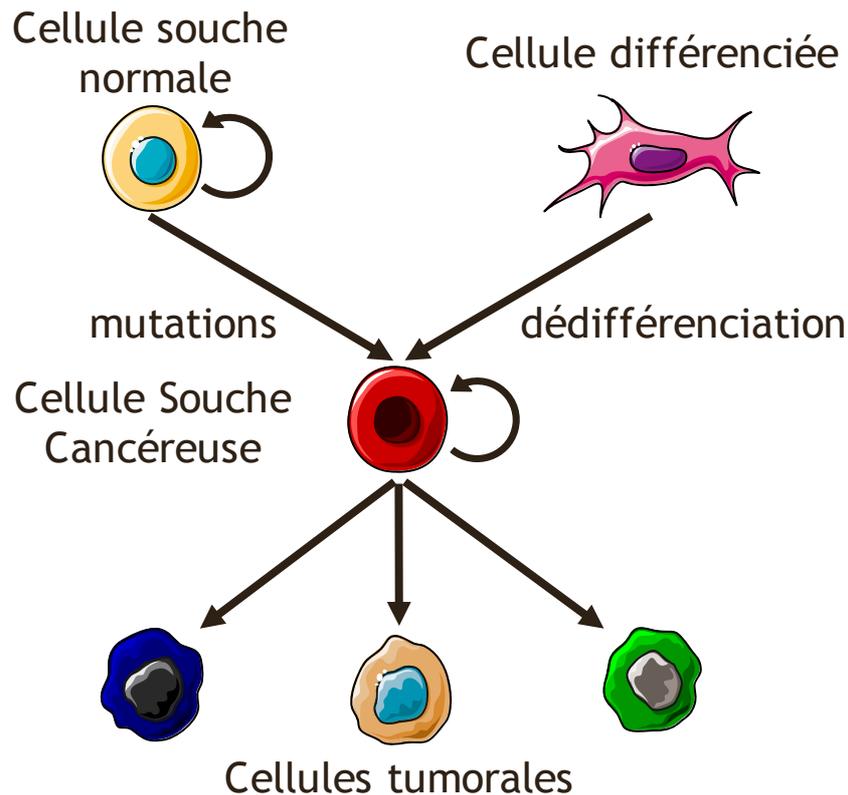


Figure 4 : Théorie de la Cellule Souche Cancéreuse

La Cellule Souche Cancéreuse est issue d'une cellule souche normale mutée ou d'une cellule différenciée reprogrammée. Elle est capable d'autorenouvellement. Et en se différenciant, elle permet la formation d'une tumeur. D'après Paldal et al., 2003.

Plus récemment, l'étude de lignées cellulaires établies à partir de neuroblastomes agressifs a permis de mettre en évidence des cellules initiatrices de la tumeur (TIC : *tumor initiating cell*) ou CSC (Hansford et al., 2007; Komuro et al., 2007; Vangipuram et al., 2009).

Ces TIC ou CSC du neuroblastome exprimeraient les marqueurs d'autorenouvellement et des progéniteurs des crêtes neurales et seraient chimiorésistantes (Hansford et al., 2007; Komuro et al., 2007; Vangipuram et al., 2009). De plus, elles sont capables de se différencier en neurones reflet de leur immaturité.

Actuellement, la caractérisation de ces cellules devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de tumorigénèse du neuroblastome et ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques (Ross and Spengler, 2007).

d) Classification du neuroblastome

La principale caractéristique du neuroblastome est son hétérogénéité clinique. Pour mieux étudier et traiter ce cancer, plusieurs classifications ont été développées selon différents critères : cliniques, histologiques, biologiques, génétiques... Elles ont pour objectif de dégager des facteurs diagnostiques et pronostiques pour déterminer la thérapie utilisée.

La classification de Evans, encore très utilisée, est basée sur 5 stades : I, II, III, IV et IVS [Tableau 1] (Evans et al., 1971). Les tumeurs de stade I représentent 5 % des neuroblastomes. Le taux de survie à 3 ans est de 95 à 100 %. Dans la plupart des cas, seul un traitement minimal est nécessaire. Le stade II représente 15 % des cas et le taux de survie à 3 ans après le traitement est de 85 à 95 % des cas. Tout comme le stade II, 15 % des patients ont une tumeur de stade III. Leur taux de survie à 3 ans est de 65 à 85 %. Les tumeurs de stade IV sont les plus agressives, 60 % d'entre elles sont *N-MYC* Amplifiées (NMA). Les neuroblastomes de stade IV représentent 50 à 60 % des cas et affectent majoritairement des enfants de plus de un an. Le taux de survie de ces enfants est de 30 %.

Stade	Caractéristiques
STADE I	La tumeur est limitée à son organe d'origine.
STADE II	La tumeur s'étend en dehors de son organe ou de sa structure d'origine, sans pour autant dépasser la ligne médiane*. Les ganglions homolatéraux régionaux peuvent être envahis.
STADE III	Le neuroblastome de stade III est une tumeur de stade II qui par contiguïté s'étend au-delà de la ligne médiane. Les ganglions régionaux controlatéraux peuvent être envahis. Certaines de ces tumeurs présentent des amplifications de <i>N-MYC</i> .
STADE IV	60 % sont <i>N-MYC</i> Amplifiées. Les patients présentent des métastases osseuses, dans les tissus mous, des ganglions à distance, la moelle osseuse...
STADE IVS	Les tumeurs de stade IVS sont observées chez les enfants de moins de un an. Ce sont des neuroblastomes de stade I ou II qui ont des métastases dans le foie, la peau ou la moelle osseuse mais pas de métastases osseuses radiologiques.
* La ligne médiane est définie comme étant la colonne vertébrale.	

Tableau 1 : Classification d'Evans

Enfin, les stades IVS sont particuliers puisque bien que présentant des métastases et apparaissant comme agressives de prime abord, ces tumeurs sont celles qui peuvent régresser spontanément avec un taux de survie à 3 ans de 60 à 80 %.

Par la suite, un groupe international, *International Neuroblastoma Staging System* (INSS), a été constitué pour mettre au point une nouvelle classification basée sur des critères reconnus par tous les membres du groupe INSS [Tableau 2] (Brodeur et al., 1988; Brodeur et al., 1993).

Stade	Caractéristiques
STADE 1	Tumeur localisée avec résection complète
STADE 2A	Tumeur unilatérale avec résection incomplète, ganglion lymphatique homolatéral et controlatéral non envahi
STADE 2B	Tumeur unilatérale avec résection complète ou incomplète, ganglion lymphatique homolatéral envahi, ganglion controlatéral non envahi
STADE 3	Tumeur non résécable étendue au-delà de la ligne médiane avec ou sans envahissement des ganglions lymphatiques régionaux Ou Tumeur unilatérale localisée avec ganglions lymphatiques controlatéraux envahis Ou Tumeur sur la ligne médiane avec envahissement des ganglions bilatéraux.
STADE 4	Tumeur primaire avec des cellules tumorales dans des ganglions distants, les os, la moelle osseuse, le foie ou d'autres organes excepté ceux définis pour le stade 4S
STADE 4S	Enfant de moins d'un an, tumeur primaire localisée comme pour les stades 1 et 2 avec une dissémination limitée au foie, à la peau et/ou à la moelle osseuse. L'envahissement de la moelle osseuse doit être minimal : moins de 10 % des cellules nucléées de la moelle doivent être tumorales. Au-delà des 10 %, la tumeur est considérée de stade 4.

Tableau 2 : Classification INSS

A partir de cette classification INSS et de l'utilisation d'autres critères génétiques et histologiques, une gradation en fonction du taux de survie a été mise en place : la classification internationale de risque ou *International Risk Grouping*

System (IRGS). Trois groupes ont ainsi été définis en fonction des critères de risques, faible, intermédiaire et haut, avec respectivement 90 %, 70 à 90 % et 30 % de survie à 3 ans après le diagnostic [Tableau 3]. Cette classification est utilisée par les cliniciens pour établir leur diagnostic et leur choix thérapeutique.

Stade INSS	Age	Statut <i>N-MYC</i>	Classification de Shimada	Ploïdie	Groupe de Risque
1	0-21 ans	Tout	Tout	Tout	Faible
2A/2B	< 1 an	Tout	Tout	Tout	Faible
	> 1 an - < 21 ans	SC	Tout	-	Faible
		NMA	Favorable	-	Faible
3	< 1 an	SC	Tout	Tout	Intermédiaire
		NMA	Tout	Tout	Haut
	> 1 an - < 21 ans	SC	Favorable	-	Intermédiaire
		SC	Défavorable	-	Haut
		NMA	Tout	-	Haut
4	< 18 mois	SC	Tout	Tout	Intermédiaire
		NMA	Tout	Tout	Haut
	> 18 mois - < 21 ans	Tout	Tout	-	Haut
4S	< 1 an	SC	Favorable	> 1	Faible
		SC	Tout	= 1	Intermédiaire
		SC	Défavorable	Tout	Intermédiaire
		NMA	Tout	Tout	Haut

Tableau 3 : Classification de risque IRGS

Ploïdie : index ADN >1 est favorable, =1 défavorable, <1 sont considéré comme >1.

Tableau adapté du National Cancer Institute

(<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/neuroblastoma/>)

Ces classifications et l'hétérogénéité clinique du neuroblastome soulèvent une question fondamentale pour la compréhension de ce cancer et son traitement : existe-t-il une évolution des tumeurs d'un stade à l'autre ou alors est-ce que chacun de ces stades représente un type tumoral différent ?

Ainsi, pour répondre à cette question, Brodeur a proposé un modèle de développement du neuroblastome aboutissant à 3 types de tumeurs [Figure 5]. Il a également émis l'hypothèse que la transition d'un type à l'autre ne se produirait que rarement si jamais elle avait lieu (Brodeur et al., 1997).

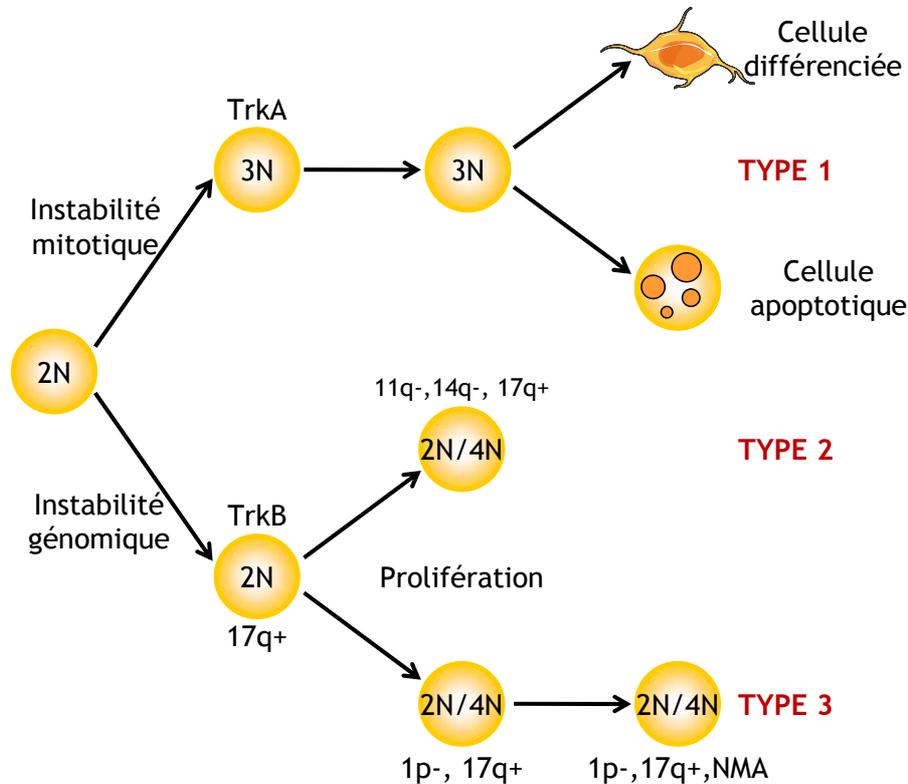


Figure 5 : Modèle d'évolution du neuroblastome

Les neuroblastomes se distingueraient en 3 types de tumeur (1, 2 et 3) en fonction des altérations acquises au cours de la tumorigenèse. Figure adaptée de Maris and Matthay 1999.

e) Neuroblastomes familiaux

Des cas de neuroblastome familial ont été décrits (Tonini et al., 2003). Ils représentent moins de 5 % des cas (Kushner et al., 1986). Ce neuroblastome familial est à transmission autosomale dominante avec une pénétrance incomplète.

Les enfants atteints de ce type de neuroblastome développent des tumeurs multiples et sont généralement plus jeunes au moment du diagnostic (Kushner *et al.*, 1986). Néanmoins, ces cas familiaux partagent la même hétérogénéité clinique que les autres neuroblastomes (Kushner *et al.*, 1986).

Knudson & Strong ont également proposé que 22 % des cas sporadiques de neuroblastome seraient dus à une nouvelle mutation dans la lignée germinale dans un gène prédisposant au neuroblastome (Knudson, Jr. and Strong, 1972). Deux gènes ont été proposés comme prédisposant au neuroblastome : le gène régulateur de la neurogenèse *PHOX2B* et le gène *ALK* récepteur orphelin à activité tyrosine kinase (Van Roy et al., 2009).

2. Famille p53/p63/p73

Lors de son activation oncogénique, *N-MYC* induit l'apoptose via la voie de signalisation de p53. Dans plus de la moitié des cancers chez l'Homme, le mécanisme d'inactivation de la voie p53 est la mutation du gène *TP53*. Or, dans le neuroblastome, *TP53* est muté ou délété dans moins de 5 % des cas (Vogan et al., 1993; Hosoi et al., 1994; Manhani et al., 1997). L'inactivation de l'apoptose passerait donc par d'autres mécanismes tels que la séquestration, la dégradation de la protéine p53 ou son inactivation.

La protéine p53 peut être séquestrée dans le cytoplasme des tumeurs non différenciées (Moll et al., 1995). Pour cette séquestration, deux protéines MDM2 et Parc (*p53-associated Parkin-like cytoplasmique protein*) coopèrent. MDM2 interviendrait en premier lieu pour exporter la protéine p53 du noyau vers le cytoplasme. La protéine Parc pourrait ensuite lier la protéine p53 et la séquestrer dans le cytoplasme au sein d'agrégats cytoplasmiques (Nikolaev et al., 2003; Moll et al., 1995). Il a été montré que la protéine Parc était surexprimée dans certains neuroblastomes et que l'inhibition de son expression permet de restaurer la sensibilité des tumeurs à certaines drogues (Nikolaev *et al.*, 2003). De plus, certaines tumeurs présentent une amplification de MDM2 (Corvi et al., 1995).

Situé dans le locus 1p36.3, région chromosomique fréquemment délétée, *TP73* a été proposé comme gène suppresseur de tumeur (voir paragraphe délétion 1p) (Kaghad et al., 1997). Toutefois, contrairement à *TP53*, le gène *TP73* est très peu muté dans les cancers et la perte de son expression chez la souris ne favorise pas la formation de tumeur. Cette dernière observation remet en cause son rôle suppresseur de tumeur (Ozaki et al., 2005).

Le gène *TP73* est impliqué dans la différenciation neuronale au cours du développement embryonnaire (Kaghad *et al.*, 1997). Ce gène code pour plusieurs isoformes [Figure 6]. Deux types d'isoformes, exprimés à partir de deux promoteurs distincts P1 et P2, se distinguent : les formes longues TAp73 (*Trans-Activated p73*) et les délétées ΔNp73 qui n'ont plus de domaine de transactivation. Ces deux groupes d'isoformes comprennent chacun plusieurs variants C-terminaux dont α, β et γ. Les formes longues TAp73 sont des inducteurs de la différenciation neuronale ou de l'apoptose. En revanche, les formes tronquées ΔNp73 peuvent interagir avec les protéines p53 et TAp73 et inhiber leurs fonctions (notamment pro-apoptotiques) (Romani *et al.*, 2003). Les protéines ΔNp73 sont donc des antagonistes de TAp73 et de p53. Or, les protéines p53 et TAp73 induisent l'expression de ΔNp73 formant ainsi deux boucles de rétrocontrôle [Figure 7] (Stiewe and Putzer, 2002; Nakagawa *et al.*, 2003).

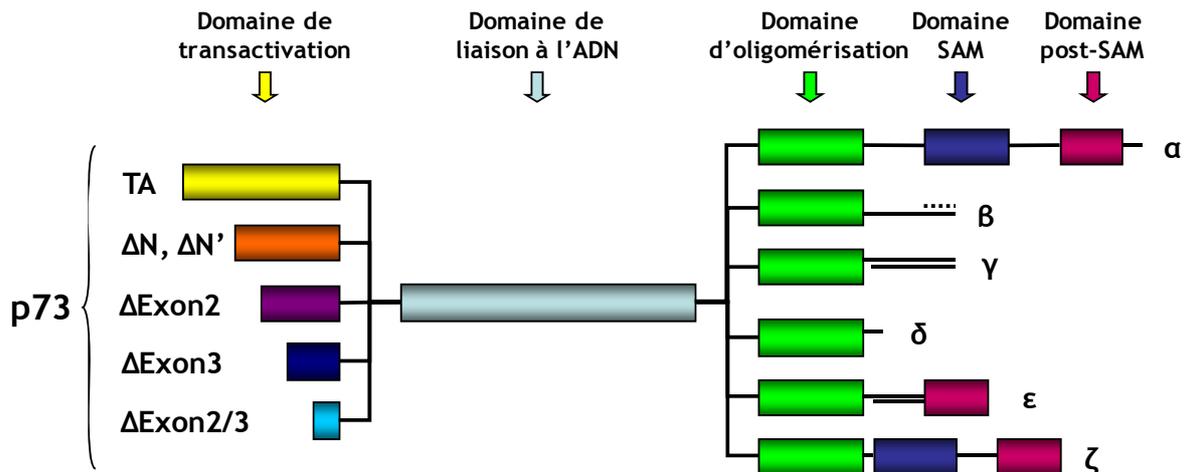


Figure 6 : Isoformes de la protéine p73
Figure adaptée de Melino *et al.*, 2002.

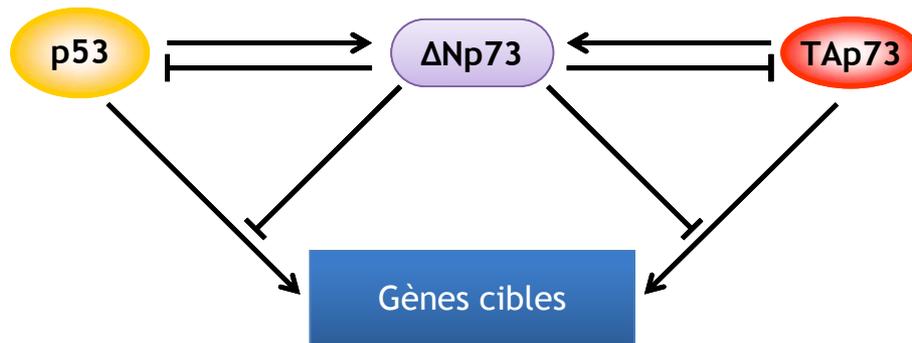


Figure 7 : Boucles de rétrocontrôle p53/p73

L'isoforme $\Delta Np73$ induit par p53 et TAp73 inhibe ces mêmes protéines et leurs fonctions d'activation de l'apoptose. Figure adaptée de Douc-Rasy et al. 2004 et Rossi et al. 2004.

Toutefois, il a été montré que les isoformes TAp73 α et $\Delta Np73\alpha$ diminuent la stabilité du transcrit du gène *N-MYC* et inhibe ainsi son expression dans le neuroblastome (Horvilleur et al., 2008). Ceci indique que les isoformes longs Tap73 et courts $\Delta Np73$ ne seraient pas totalement antagonistes et qu'ils pourraient partager des fonctions communes.

La délétion ou l'amplification du gène *TP73* n'est donc pas informative quant au rôle de ce gène dans le processus tumoral. C'est le rapport entre les formes longues et tronquées qui doit être analysé [Figure 8]. En effet, il apparaît que la protéine N-Myc inhibe l'expression de TAp73 (Zhu et al., 2002). Et $\Delta Np73$ est exprimé dans environ 30 % des tumeurs (Douc-Rasy et al., 2002; Casciano et al., 2002). Ces deux mécanismes induisent une modification du ratio TAp73/ $\Delta Np73$ en faveur de $\Delta Np73$.

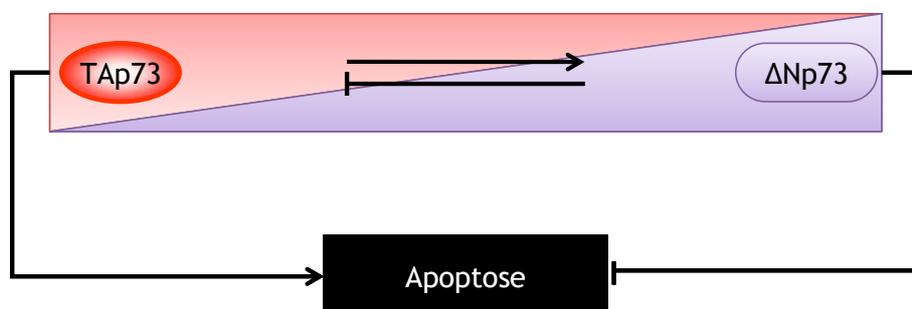


Figure 8 : Ratio entre les isoformes $\Delta Np73$ et TAp73

Le déséquilibre du rapport entre les isoformes $\Delta Np73$ et TAp73 en faveur de $\Delta Np73$ est un facteur de mauvais pronostic dans le neuroblastome. Figure interprétée et adaptée de Goldschneider et al. 2003.

De plus, même s'il n'a pas été montré directement que l'expression de $\Delta Np73$ intervient dans l'initiation ou au cours du processus tumoral, elle est un facteur de mauvais pronostic dans le neuroblastome. $\Delta Np73$ pourrait ainsi être responsable de l'inhibition de l'apoptose dans certaines tumeurs.

3. Biologie du neuroblastome

L'hétérogénéité clinique des neuroblastomes préfigure leur hétérogénéité biologique et génétique. De nombreuses anomalies ont été identifiées et sont utilisées pour affiner le diagnostic et le pronostic des neuroblastomes (Brodeur et al., 1997; Maris and Matthay, 1999; Westermann and Schwab, 2002).

En effet, certaines altérations génétiques, comme l'amplification de *N-MYC*, prédisent fortement la réponse au traitement. Néanmoins l'échec des traitements peut arriver pour tous les sous-groupes de patients ce qui met en évidence le besoin de marqueurs pronostiques supplémentaires.

a) Ploidie

Il a d'abord été montré que les tumeurs dont les cellules sont hyperdiploïdes répondent mieux au traitement que celles qui sont diploïdes (Look et al., 1984). Par la suite, les neuroblastomes ont été classés en quatre catégories en fonction de la ploïdie : diploïde, triploïde, tétraploïde et pentaploïde (Kaneko et al., 1987). Le recoupement entre cette première classification et le pronostic clinique a permis de distinguer deux groupes : les tumeurs diploïdes/tétraploïdes, et les triploïdes (ou hyperdiploïdes)/pentaploïdes.

Les tumeurs diploïdes/tétraploïdes présentent une instabilité génétique générale (Brodeur et al. 1997). Elles sont caractérisées par de nombreux réarrangements chromosomiques incluant des amplifications, des délétions et des translocations non équilibrées (Brodeur *et al.*, 1997). Au contraire, les cellules tumorales triploïdes/pentaploïdes ont des défauts basiques dans la machinerie de la mitose et la ségrégation des chromosomes (Brodeur et al. 1997). Elles présentent un gain de chromosomes global avec peu de réarrangements structuraux (Kaneko et al. 1987; Hayashi et al. 1989).

Les tumeurs diploïdes/tétraploïdes se retrouvent d'avantage chez les enfants de plus d'un an et sont des marqueurs défavorables (Look *et al.*, 1984; Bourhis *et al.*, 1991). Les cellules triploïdes/pentaploïdes sont principalement observées dans des neuroblastomes de bas grade chez des enfants de moins de un an (Look *et al.*, 1984; Gansler *et al.*, 1986; Oppedal *et al.*, 1989; Cohn *et al.*, 1990a). Néanmoins, la ploïdie cellulaire perd son facteur pronostic pour les patients de plus de 2 ans (Look *et al.*, 1991).

b) Anomalies cytogénétiques

(1) Gain du chromosome 17

Le gain du bras long du chromosome 17 (17q) est l'anomalie cytogénétique la plus fréquente dans le neuroblastome puisqu'elle est retrouvée dans 50 % à 75 % des cas (Meddeb *et al.*, 1996; Brinkschmidt *et al.*, 1997; Lastowska *et al.*, 1997; Plantaz *et al.*, 1997; Altura *et al.*, 1997). La partie minimale concernée par ce gain est la région 17q21.3-qter qui contient notamment en 17q25 le gène de la survivine, inhibiteur de l'apoptose (Gilbert *et al.*, 1984; Meddeb *et al.*, 1996; Plantaz *et al.*, 1997). Cette anomalie favoriserait ainsi la surexpression de la survivine et la survie des cellules tumorales (Islam *et al.*, 2000).

Le gain du 17q est associé à des tumeurs de haut grade présentant également dans la majorité des cas une perte du chromosome 1p, une amplification de *N-MYC* ainsi qu'un profil diploïde/tétraploïde des cellules tumorales (Van Roy *et al.*, 1994; Bown *et al.*, 1999; Vandesompele *et al.*, 2001). Cette trisomie partielle est généralement observée chez les enfants de plus d'un an (Bown *et al.*, 1999). Les analyses multivariées ont montré que le gain du chromosome 17q est un facteur de mauvais pronostic (Meddeb *et al.*, 1996; Lastowska *et al.*, 1997; Abel *et al.*, 1999; Bown *et al.*, 1999).

Au-delà du gain du 17q, certaines tumeurs présentent une trisomie du chromosome 17 entier (Plantaz *et al.*, 1997). Cette trisomie se retrouve dans des neuroblastomes de bas grade et n'est pas un facteur de mauvais pronostic (Vandesompele *et al.*, 2001).

(2) Perte du chromosome 1

Les délétions partielles de chromosomes sont des anomalies cytogénétiques fréquentes dans le neuroblastome. La première d'entre elles, la perte du bras court du chromosome 1 (1p) est observée dans 19 à 36 % des tumeurs primaires (Fong et al., 1989;Fong et al., 1992;White et al., 1995;Takita et al., 1995;Maris et al., 1995;Gehring et al., 1995;Martinsson et al., 1995;Caron et al., 1996b). Celle-ci est observée dans les tumeurs de stade avancé et est notamment corrélée avec l'amplification de *N-MYC* et le gain du 17q (Fong et al., 1989;Fong et al., 1992;Maris et al., 1995;Caron et al., 1996b;Schleiermacher et al., 1996;Rubie et al., 1997). C'est la partie distale du 1p (1p36) qui est la plus souvent perdue. La région commune aux différents cas apparaît être le segment 1p36.2 - 1p36.3 qui contient notamment le gène suppresseur de tumeur *TP73* (White *et al.*, 1995). La perte d'hétérozygotie du gène *TP73* a donc logiquement été proposée comme processus intervenant dans le développement du neuroblastome (Kaghad *et al.*, 1997).

(3) Perte du chromosome 11

A l'instar de la perte du 1p, le bras long du chromosome 11 (11q) est délété dans certains neuroblastomes. La perte du 11q est observée dans 15 à 30 % des neuroblastomes (Mertens et al., 1997;Takita et al., 1995;Srivatsan et al., 1993). La délétion du 11q est un facteur de mauvais pronostic, elle caractérise les tumeurs de stade avancé Simple Copie pour *N-MYC* (Guo et al., 1999). Le locus 11q23.3 est la région commune aux délétions du 11q (Guo *et al.*, 1999).

La corrélation entre la délétion du 11q et les tumeurs simple copie de haut grade suggère un rôle important d'un ou plusieurs gènes présents sur ce chromosome. Appuyant cette hypothèse, Bader et ses collaborateurs ont montré que le transfert d'un chromosome 11 intact dans une lignée de neuroblastome (NB NGP) induit la différenciation des cellules (Bader et al., 1991). Par la suite, le groupe de Speleman a confirmé cette observation et distingué trois régions pouvant contenir le gène responsable de la différenciation (De Preter et al., 2005).

D'autres groupes ont émis l'hypothèse qu'un gène suppresseur pourrait être localisé sur le bras long du chromosome 11 (Maris et al., 2001). Plusieurs gènes candidats, *CADM1*, *TSLC1*, *PHOX2A*, ont ainsi été identifiés (Michels et al., 2008; Ando et al., 2008; Wilzen et al., 2009). Des études sont encore nécessaires pour déterminer le rôle de ces gènes candidats ou identifier de nouveaux gènes présents sur le chromosome 11 et susceptibles d'intervenir dans le développement de tumeurs de haut grade simple copie pour *N-MYC*.

(4) Perte du chromosome 14

La perte du bras long du chromosome 14 (14q) a été identifiée en 1989 dans le neuroblastome (Suzuki et al., 1989). Elle est retrouvée dans environ 27 % des neuroblastomes (Fong *et al.*, 1992; Takayama et al., 1992; Takita *et al.*, 1995). La région délétée commune est la partie terminale du bras long 14q32-qter (Takayama *et al.*, 1992). Bien que la perte du 14q soit observée dans des tumeurs de stade avancé, elle n'est pas corrélée à la perte du 1p ni au statut de *N-MYC* (Fong *et al.*, 1992)

(5) Autres chromosomes

Enfin, au-delà des chromosomes 1, 11 et 14, d'autres pertes d'hétérozygoties chromosomiques ont été identifiées : les délétions du 2q, 3p, 4p, 5q, 9p et 18q (Takita et al., 1995; Caron et al., 1996a; Meltzer et al., 1996; Reale et al., 1996; Takita et al., 1997; Ejeskar et al., 1998).

c) Dérégulation de *N-MYC*

C'est en analysant des séquences amplifiées homologues à l'oncogène *c-MYC* que le gène *N-MYC* a été identifié dans le neuroblastome (Schwab et al., 1983; Kohl et al., 1983). Deux groupes de neuroblastomes ont été définis en fonction du statut des cellules pour *N-MYC* : Simple Copie (SC) ou *N-MYC* Amplifié (NMA).

(1) Amplification de *N-MYC*

L'amplification de l'oncogène *N-MYC* est l'anomalie génétique la mieux caractérisée dans le neuroblastome. Elle est retrouvée dans 25 à 33 % des cas (Brodeur et al., 1984;Kohl et al., 1984;Hogarty, 2003). C'est également la caractéristique la plus importante, systématiquement recherchée, puisqu'elle est au cœur du choix thérapeutique. Toutefois, deux sous-groupes de tumeurs NMA sont distinguées en fonction du nombre de copies du gène *N-MYC* : inférieur ou supérieur à 10 copies.

En effet, certaines tumeurs présentent un niveau intermédiaire d'amplification, moins de 10 copies de *N-MYC* qui reflète une petite amplification ou une aneuploïdie (Nakagawara et al., 1988). Contrairement aux tumeurs avec plus de 10 copies, ces tumeurs à niveau intermédiaire sont sensibles à la chimiothérapie.

Pour le second groupe, le nombre de copies de *N-MYC* peut être de plusieurs centaines (Corvi *et al.*, 1995). Ce sont ces tumeurs qui sont plus généralement désignées tumeurs NMA. Cette amplification est observée dans des tumeurs non différenciées, invasives et agressives de stade avancé (Brodeur *et al.*, 1984;Kohl *et al.*, 1984;Brodeur et al., 1986;Nakagawara *et al.*, 1988;Hogarty, 2003).

L'amplification de *N-MYC* (>10 copies) est un facteur de mauvais pronostic. En effet, pour les tumeurs NMA, le taux de survie globale à 1 an est inférieur à 10 % alors que ce même taux à 5 ans est de 60 % pour les tumeurs non NMA (Seeger et al., 1985). Au vu de cette corrélation, l'amplification de *N-MYC* a été proposée comme un événement tardif du processus tumoral du neuroblastome (Brodeur *et al.*, 1984;Kohl *et al.*, 1984).

Le gène *N-MYC* est amplifié via des chromosomes *Double-Minute* (DM) et des *Homogeneously Staining Regions* (HSR) (Kohl et al., 1983;Schwab et al., 1983;Schwab et al., 1984). Ces chromosomes DM et domaines HSR ont été identifiés et décrits dans le neuroblastome avant l'identification de *N-MYC* (Biedler et al., 1973b;Brodeur et al., 1977).

La région amplifiée dans les DM et HSR peut aller de 100 kb à plus de 1 Mb (Amler and Schwab, 1989). Ainsi, d'autres gènes, tel que celui de l'Ornithine

Décarboxylase (*ODC*), peuvent être co-amplifiés avec *N-MYC*. Mais seul le gène *N-MYC* a été retrouvé dans toutes les amplifications analysées dans le neuroblastome (Reiter and Brodeur, 1996).

Les mécanismes d'amplification restent mal connus. L'amplification aurait lieu via des processus de réplication/recombinaison qui forment des éléments extra-chromosomiques en cercle visibles sous la forme de chromosomes DM qui pourraient ensuite s'intégrer indifféremment sur un chromosome normal pour former les HSR. Une fois intégrés à un chromosome, les amplicons pourraient être à nouveau amplifiés in situ. Ces mécanismes d'amplification permettent d'avoir jusqu'à plusieurs centaines de copies du gène *N-MYC* au sein d'une même cellule (Seeger et al., 1988). Et il apparaît qu'au sein d'une tumeur le nombre de copies de *N-MYC* est généralement constant entre les différents sites mais aussi au cours du temps (Brodeur et al., 1987).

Après amplification, le nombre de copies du gène *N-MYC* se retrouve alors en excès par rapport aux protéines et mécanismes de régulation physiologique de *N-MYC*. Ces derniers ne suffisent donc plus pour réguler l'expression de *N-MYC* (Sivak et al., 1997). Ces transcrits étant eux-mêmes traduits, ce sont donc les copies surnuméraires de *N-MYC* issues de l'amplification qui induisent une surexpression protéique de *N-MYC* (Wenzel et al., 1991).

Enfin, à l'issue de l'amplification, il reste toujours une copie de *N-MYC* à son locus originel, 2p24. Et dans certains cas, il est observé une duplication in situ qui pourrait être la phase initiale de l'amplification de *N-MYC* ou un processus indépendant (Corvi *et al.*, 1995).

(2) Simple Copie pour *N-MYC*

Parmi les tumeurs et lignées de neuroblastome Simple Copie pour *N-MYC*, certaines présentent des niveaux d'expression élevés des transcrits *N-MYC* et parfois comparables à ceux retrouvés dans des lignées *N-MYC* Amplifiées (Kohl *et al.*, 1984; Cohn et al., 1990b; Wada et al., 1993).

Physiologiquement, l'expression de *N-MYC* est finement régulée et ce à plusieurs niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel (voir partie gènes *MYC*). Or, dans les tumeurs Simple Copie qui

présentent une surexpression de *N-MYC*, il a été montré que la dérégulation de l'expression de *N-MYC* serait due à une inhibition de la dégradation des protéines N-Myc plutôt qu'à la perte de la régulation transcriptionnelle du gène (Cohn *et al.*, 1990b; Sivak *et al.*, 1997).

Toutefois, dans ce contexte, la surexpression de *N-MYC* ne semble pas corrélée avec un phénotype particulier puisqu'elle est observée dans des tumeurs de différents stades et pronostics (Seeger *et al.*, 1988).

(3) *N-MYC* principal oncogène du neuroblastome

Jusqu'à aujourd'hui, peu d'oncogènes impliqués dans la transformation tumorale de cellules dérivées de la crête neurale ont été identifiés. Par conséquent, même si les cibles exactes affectées par sa surexpression n'ont pas encore été identifiées, l'oncogène *N-MYC* est un élément clé de la tumorigenèse du neuroblastome. Et ce d'autant plus qu'il est impliqué dans d'autres tumeurs neurectodermiques telles que le rétinoblastome, l'astrocytome, les gliomes, ou le cancer pulmonaire à petites cellules (Lee *et al.*, 1984; Garson *et al.*, 1985; Schwab *et al.*, 1985; Nau *et al.*, 1986).

d) *MDM2* & *CASP8*

D'autres gènes ont également été proposés comme intervenant dans le processus tumoral du neuroblastome dont deux acteurs importants de l'apoptose *MDM2* et *CASP8*. Tout comme *N-MYC*, *MDM2* peut être amplifié jusqu'à 40 copies dans certaines tumeurs (Corvi *et al.*, 1995). De plus, *MDM2* a été identifiée comme cible transcriptionnelle de *N-MYC* (Slack *et al.*, 2005). Dans ces deux cas de figure, la protéine *MDM2* peut être surexprimée et se retrouver en excès par rapport à p53. Et, comme *MDM2* se lie à p53 et induit sa dégradation, la protéine p53 se retrouve ainsi inactivée (Slack and Shohet, 2005).

Enfin, la délétion ou le blocage de l'expression par la méthylation du gène *CASP8* a été également observée dans certains neuroblastomes *N-MYC* amplifiés (Teitz *et al.*, 2000; Takita *et al.*, 2001). Ce gène code pour la caspase 8, effecteur

de l'apoptose induite par la voie de signalisation de p53. La perte d'expression du gène *CASP8* pourrait être dans certains neuroblastome le second événement nécessaire pour l'inactivation de l'apoptose induite par l'activation oncogénique de *N-MYC*.

e) Récepteurs neurotrophiques

Les neurotrophines sont des facteurs de croissance essentiels pour le développement neuronal. Pour le système nerveux sympathique, les facteurs neurotrophiques les plus importants sont le *Nerve Growth Factor* (NGF), le *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) et les Neurotrophines (NT) 3 et 4.

Le NGF est important pour la croissance cellulaire, la différenciation, et la survie des neurones sympathiques dérivés de la crête neurale (Raffioni et al., 1993). Le NGF peut se fixer aux deux récepteurs p75NTR (*p75 Neurotrophine Receptor*) et TrkA (*Tropomyosine related kinase A*) avec respectivement une faible et une forte affinité (Johnson et al., 1986; Klein et al., 1991a; Kaplan et al., 1991).

Le BDNF et la NT4 se fixent avec une forte affinité au récepteur TrkB (Klein et al., 1991b; Klein et al., 1992). Enfin, la NT3 peut activer les 3 récepteurs TrkA, TrkB et TrkC (Cordon-Cardo et al., 1991; Klein et al., 1991b; Lamballe et al., 1991). Les récepteurs TrkA, TrkB et TrkC sont trois récepteurs homologues à activité tyrosine kinase exprimés à la surface des cellules neurales qui s'homodimérisent lors de la fixation du ligand.

Du fait de l'origine embryonnaire du neuroblastome, les voies de signalisation des neurotrophines dans ces tumeurs ont été l'objet de nombreuses études. Il en est ressorti que les récepteurs TrkA, TrkB et TrkC pouvaient avoir un rôle dans le processus tumoral ou être des marqueurs de phénotypes cliniques et ce d'autant plus que TrkA avait été caractérisé comme un oncogène dans le cancer du colon (Martin-Zanca et al., 1986).

(1) p75NTR

Le facteur de croissance NGF a une faible affinité pour le récepteur p75NTR autrement appelé LNGFR, *Low affinity NGF Receptor*, en référence à cette faible affinité. Dans les neurones n'exprimant pas le récepteur TrkA, p75NTR agit tel un

récepteur à dépendance : en absence du ligand, NGF, p75NTR induit la mort des cellules par apoptose. La liaison de NGF à p75NTR inhibe l'induction de l'apoptose par p75NTR (Rabizadeh et al., 1993).

Dans les cellules qui expriment également TrkA, la fonction exacte de p75NTR est encore mal connue. Le récepteur p75NTR serait capable d'interagir avec le récepteur TrkA pour former un « super » récepteur qui aurait encore plus d'affinité pour le NGF (Hempstead et al., 1991). Malgré un consensus autour d'un rôle de p75NTR comme modulateur de la réponse de TrkA au NGF, le sens de la modulation pourrait être différent en fonction du type cellulaire. En effet, p75NTR pourrait soit induire l'apoptose soit au contraire renforcer l'action de TrkA dans l'induction de la survie des neurones (Barrett, 2000).

(2) *TrkA*

Le récepteur TrkA est préférentiellement exprimé sur les neurones en développement. L'interaction du NGF avec les homodimères de TrkA induit l'autophosphorylation activatrice du récepteur. Une fois phosphorylés, les récepteurs TrkA phosphorylent à leur tour les résidus tyrosine de différentes protéines dont des kinases (sérine/thréonine et MAPK) (van der et al., 1994).

La présence de NGF induit la croissance et la différenciation de ces mêmes cellules comme cela a été montré après transfection de TrkA et traitement au NGF de cellules de neuroblastome qui n'exprimaient pas TrkA (Lavenius et al., 1995; Lucarelli et al., 1997).

Dans le cadre du neuroblastome, une forte expression de TrkA est un facteur pronostic favorable. Elle est retrouvée dans les tumeurs de bas grade, et particulièrement chez les nourrissons de moins d'un an (Nakagawara et al., 1993; Tanaka et al., 1995; Brodeur *et al.*, 1997; Svensson et al., 1997). La surexpression de TrkA est inversement corrélée avec l'amplification de *N-MYC* (Nakagawara et al., 1992; Combaret et al., 1997). A l'inverse, la perte d'expression de TrkA est corrélée avec un mauvais pronostic (Suzuki et al., 1993).

(3) *TrkB*

Le récepteur TrkB a pour ligand le BDNF et la NT4. En présence de BDNF, TrkB induit la prolifération des cellules et favorise leur survie. La forme complète, en opposition à la forme tronquée, de TrkB est exprimée dans les neuroblastomes NMA (Nakagawara et al., 1994; Aoyama et al., 2001). Elle est accompagnée d'une expression autocrine de BDNF par les cellules tumorales qui permet ainsi la mise en place d'une boucle activatrice de la prolifération et de la survie cellulaire (Nakagawara *et al.*, 1994; Aoyama *et al.*, 2001).

En revanche, les tumeurs qui expriment la forme tronquée de TrkB ont un pronostic favorable. Ce rôle antagoniste de la forme complète est due à la délétion du domaine tyrosine kinase pour la forme tronquée (Aoyama *et al.*, 2001; Haapasalo et al., 2001).

(4) *TrkC*

Le récepteur TrkC a une forte affinité pour la NT3. Il est généralement exprimé sur les mêmes cellules que TrkA dans les tumeurs de bon pronostic (Ryden et al., 1996; Yamashiro et al., 1996; Svensson *et al.*, 1997). L'expression de TrkC n'est pas un facteur pronostic indépendant de TrkA.

De plus, il a été récemment décrit que le récepteur TrkC était un récepteur à dépendance et qu'en absence de son ligand la NT3, il induisait l'apoptose de neuroblastes olfactifs immortalisés (lignée 13.S.24) (Tauszig-Delamasure et al., 2007). Il a par la suite été rapporté que les tumeurs de neuroblastome qui expriment le récepteur TrkC sécrètent également de manière autocrine son ligand la NT3 (Bouzas-Rodriguez et al., 2009). Dans cette même étude, les auteurs suggèrent que le blocage de la liaison TrkC-NT3 permettrait d'enclencher l'apoptose des cellules tumorales. Ainsi, dans le neuroblastome, l'expression de TrkC pourrait être un facteur limitant pour la progression tumorale puisque les tumeurs qui l'expriment doivent compenser celle-ci en exprimant la NT3 ou en restant dans un environnement riche en NT3.

f) Récepteurs à dépendance

Après p75NTR et TrkC, un troisième récepteur à dépendance pourrait avoir un rôle important dans le neuroblastome. Au Centre Léon Bérard, il a été montré que la nétrine-1, ligand des récepteurs à dépendance DCC et UNC5H, était surexprimée de façon autocrine dans 38 % des neuroblastomes de stade 4 chez les enfants de plus de un an. Il a également été rapporté que la disruption de la boucle autocrine induisait l'apoptose de manière active par UNC5H et l'inhibition de la dissémination des cellules humaines de neuroblastome *in vivo* chez la souris (Delloye-Bourgeois et al., 2009). Il a ainsi été suggéré que l'inhibition des ligands des récepteurs à dépendance, et en particulier la nétrine-1, pourrait être une nouvelle piste de traitement des neuroblastomes agressifs.

4. Caractérisation du transcriptome et de l'épigénome des tumeurs de neuroblastome

L'émergence de nouvelles techniques d'analyse globale de l'expression de gènes ou de profils épigénétique a permis d'appréhender une approche globale des anomalies génétiques et cytogénétiques du neuroblastome.

Les premières études d'expression génomique ont été réalisées à l'aide de puces Affimetrix U95 composée de 62839 sondes (représentant près de 10000 gènes) et ont permis l'identification de gènes dérégulés conjointement ou en réponse à la surexpression de l'oncogène *N-MYC*. Ainsi, Alaminos et ses collaborateurs ont identifiés 74 gènes surexprimés et 148 sous-exprimés dans les tumeurs exprimant fortement *N-MYC* (Alaminos et al., 2003). Parmi les gènes dont la fonction était connue, des gènes impliqués dans la différenciation neurale, la prolifération cellulaire et des oncogènes tel TGF β 1 ou c-Kit ont été retrouvés.

De même, au laboratoire, c'est grâce à l'analyse de puces Affimetrix que la surexpression du gène *TWIST1* a été corrélée à l'amplification de *N-MYC* (Valsesia-Wittmann et al., 2004).

Par la suite, Oberthuer et ses collaborateurs ont développé une puce Agilent 11K (10163 sondes) optimisée pour l'analyse de l'expression de gènes pour

le neuroblastome et ont montré qu'elle pouvait être utilisée pour déterminer ou affiner le pronostic clinique (Oberthuer et al., 2006). A l'aide du même type de puce, il a également été montré que les neuroblastomes de bon ou de mauvais pronostic présentaient des profils d'expression différents pour les gènes cibles des facteurs Myc (c-Myc et N-Myc) et qu'ainsi ces gènes cibles pouvaient intervenir dans le processus tumoral (Westermann et al., 2008).

Enfin, l'évolution des puces à ADN a permis le développement d'une nouvelle technique : le CHIP-chip ou CHIP-on-chip. Des immunoprécipitations de chromatine (CHIP) sont d'abord réalisées à l'aide des échantillons d'ADN. Ensuite, les anticorps et protéines sont séparés des fragments d'ADN précipités. Enfin, ces extraits d'ADN sont analysés sur des puces à ADN pour avoir un résultat global.

Grâce à cette technique, il a été possible d'analyser les profils de fixation des facteurs Myc (c-Myc et N-Myc) et d'identifier de nouvelles cibles transcriptionnelles (Westermann et al., 2008; Murphy et al., 2009).

Le groupe de Stallings a ainsi montré que, dans les cellules présentant une amplification de *N-MYC*, les protéines N-Myc se fixaient au promoteur de nombreux gènes dont ceux codant pour des régulateurs de la transcription ou des hélicases (Murphy et al., 2009). Les résultats de cette étude ont permis aux auteurs de suggérer que la dérégulation de l'expression de *N-MYC* pouvait affecter l'expression de nombreux gènes et que *N-MYC* pourrait jouer un rôle dans la structure globale de la chromatine. La dérégulation de l'expression de *N-MYC* dans les neuroblastomes pourrait ainsi favoriser la progression tumorale en dérégulant (inhibant ou induisant) l'expression de gènes cibles de façon directe en se fixant à leur promoteur mais également de façon indirecte en modifiant la structure de la chromatine environnante : conformation ouverte pour les gènes induits par *N-MYC* ou fermée pour les cibles réprimées.

Ces différentes approches globales permettent de mettre en évidence l'importance d'un mécanisme ou d'une voie de signalisation cellulaire qui aurait pu être initialement écartée ou oubliée. De plus, associé à d'autres critères existants ou en développement notamment histologiques, cytologiques, génétiques..., leur utilisation devraient trouver une application dans la classification des

neuroblastomes. Ceci devrait à terme, permettre l'application au diagnostic précoce, en test pronostique ou prédictif de la réponse mais également pour le suivi thérapeutique afin de personnaliser le traitement en limitant les effets toxiques.

5. Dépistage et prise en charge

a) Dépistage

Les neuroblastomes produisent fréquemment des niveaux de catécholamines élevés qui sont détectables dans les urines. Cette propriété a été utilisée par plusieurs pays (Etats-Unis, Japon et en Europe de l'Ouest) et en particulier au Centre Léon Bérard pour des dépistages généralisés (Bessho et al., 1991; Woods et al., 1992; Berthold et al., 1999; Mathieu et al., 1996; Erttmann et al., 1998). Ces études reposaient sur l'hypothèse que le neuroblastome est un cancer qui évolue des stades localisés peu agressifs vers les stades agressifs selon le schéma stade 1, puis 2, puis 3 et enfin 4. Le but de ces dépistages était de diagnostiquer les neuroblastomes plus précocement avant les stades avancés qui sont incurables.

En fait, ces expérimentations ont eu pour résultat un doublement des cas de neuroblastome dans les populations étudiées sans aucun changement sur le nombre de stades avancés. Ces dépistages ont mis en évidence que, parce qu'ils régressent spontanément, de nombreux cas de neuroblastome ne sont pas habituellement diagnostiqués (Bessho *et al.*, 1991; Woods *et al.*, 1992; Berthold *et al.*, 1999).

Enfin, les résultats de ces dépistages massifs confirment que les différents stades de neuroblastome correspondent à des tumeurs de types différents et non pas à une gradation d'une tumeur de stade en stade (1, 2, 3 puis 4). Ainsi, les dépistages systématiques pour le neuroblastome ne présente pas d'intérêt médical pour les patients et ont été abandonnés (Philip, 1999).

b) Traitements

La chimiothérapie est importante dans le traitement du neuroblastome, car, par rapport à d'autres cancers, le neuroblastome présente la particularité d'être

chimiosensible. De plus, plus de 60 % des patients présentent des métastases au diagnostic. En effet, il a été observé que les drogues cytotoxiques et les dérivés rétinoïques induisent respectivement une apoptose massive ou la différenciation des cellules de neuroblastome (Ribatti et al., 2001).

Le choix thérapeutique est lié à la classification IRGS des patients par groupe de risque. Les patients de bas-risque n'ont besoin que d'une prise en charge minimale. Pour plus de 90 % d'entre eux, la chirurgie est suffisante (Alvarado et al., 2000;Perez et al., 2000). Certaines tumeurs nécessitent une chimiothérapie après l'exérèse chirurgicale.

Pour les patients de risque intermédiaire, le choix usuel est une chimiothérapie d'induction suivie de l'exérèse chirurgicale. Et, le cas échéant, les enfants sont traités par chimiothérapie de consolidation.

Enfin, les neuroblastomes de haut risque sont traités par des chimiothérapies combinant plusieurs drogues cytotoxiques et myéloablatives suivies de réinjection de cellules souches hématopoïétiques autologues. En cas de progression de la maladie ou à but palliatif, la chimiothérapie peut être couplée par la radiothérapie. Mais, l'usage de l'irradiation est restreint et réservé aux tumeurs chimiorésistantes pour limiter les dommages portés aux tissus sains qui sont plus sensibles chez l'enfant.

De nouvelles thérapeutiques sont aussi en cours d'essais cliniques dont plusieurs types de molécules pour la chimiothérapie. Des dérivés de la vitamine A tels que les rétinoïdes sont en phase de test pour leurs propriétés d'inducteurs de la différenciation des neuroblastes ou d'inhibiteurs de l'angiogenèse (Matthay et al., 1999;Ribatti *et al.*, 2001).

B. La famille MYC

Dans la partie précédente, nous avons vu que dans certains cas de neuroblastome, un gène, *N-MYC*, est amplifié et son expression est dérégulée. Le gène *N-MYC* fait partie de la famille des gènes *MYC* qui comprend également deux autres membres chez l'Homme : *c-MYC* et *L-MYC*. Ces trois gènes codent pour des facteurs de transcription.

1. Les gènes MYC et leur structure

a) c-MYC

Le premier membre de la famille *MYC* identifié est le gène *c-MYC*. C'est en étudiant des poulets infectés par les virus de la myélocytomatose aviaire MC29 que Vennstrom et ses collaborateurs ont découvert un homologue cellulaire, *c-MYC*, de l'oncogène viral *v-MYC* (Vennstrom et al., 1982). Par la suite, le groupe de Papas a isolé et cloné le gène *c-MYC* chez l'Homme (Watson et al., 1983). Le gène *c-MYC* se situe en 8q24.21 et code pour une protéine de 64 kDa composée de 439 aa.

b) N-MYC

Le gène *N-MYC* a été découvert à partir de l'étude des régions amplifiées dans les chromosomes DM et HSR de plusieurs lignées de neuroblastome (dont IMR32 et LAN-1) (Schwab *et al.*, 1983; Kohl *et al.*, 1983). Le gène *N-MYC*, situé en 2p24.1, code pour 2 protéines de 456 et 464 aa, via 2 sites d'initiation de la traduction différents. Ces deux protéines N-Myc font respectivement 58 et 64 kDa (Makela et al., 1989).

c) L-MYC

Le gène *L-MYC* situé en 1p34.2 code pour deux isoformes protéiques de 364 et 206 aa respectivement pour les isoformes 1 et 2. Le gène *L-MYC* a été découvert amplifié jusqu'à 20 fois et exprimé dans des cancers pulmonaires à petite cellule par homologie de séquence avec les gènes *c-MYC* et *N-MYC* (Nau et al., 1985).

d) Structure des protéines Myc

La structure des protéines Myc est généralement décomposée en deux grands domaines. La partie N-terminale correspond au domaine de transactivation. Et, le domaine de fixation à l'ADN est en C-terminal [Figure 9] (Cowling and Cole, 2006).

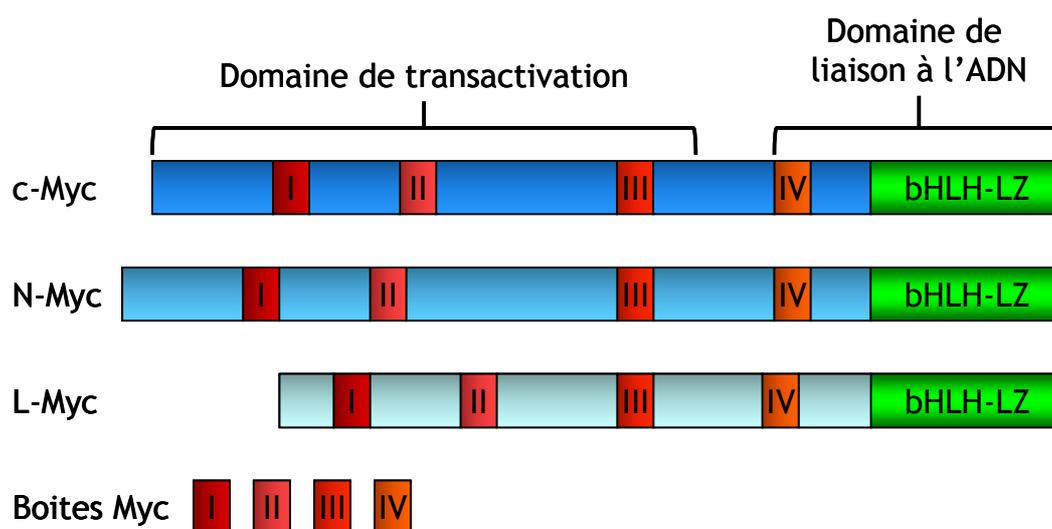


Figure 9 : Protéines Myc humaines

Les protéines Myc humaines ont trois « boites Myc » dans le domaine de transaction et à l'extrémité C-terminale, le domaine de liaison à l'ADN est composé de la « boite Myc » IV et d'un motif bHLH-LZ.

Les protéines Myc présentent quatre motifs spécifiques : les Boites Myc (MB). Les motifs MBI, MBII et MBIII sont dans la partie N-terminale. La dernière boite Myc, MBIV, se retrouve dans la partie C-terminale. Les domaines MBI et MBII sont essentiels pour l'induction de l'apoptose et l'inhibition de la différenciation (Evan et al., 1992; Freytag et al., 1990). Le domaine MBIII est nécessaire pour la transformation tumorale induite par Myc et sa délétion augmente les propriétés apoptotiques des protéines Myc (Herbst et al., 2005). Enfin, MBIV intervient dans la fixation de Myc à l'ADN et sa délétion induit un blocage des cellules en G2 (Cowling et al., 2006).

Les protéines Myc possèdent également à l'extrémité C-terminale un super-domaine bHLH-LZ composé lui-même de trois domaines : une région riche en acides

aminés basiques (b), un domaine *helix-loop-helix* (HLH) et un motif *leucine zipper* (LZ).

C'est le domaine bHLH-LZ qui permet la spécificité de fixation à l'ADN des protéines Myc. C'est également grâce à lui que les protéines Myc peuvent former des dimères. Les protéines Myc peuvent constituer des hétérodimères avec d'autres protéines à motif HLH-LZ dont la protéine Max (*Myc Associated factor X*) que nous verrons par la suite (Murre et al., 1989). En revanche, bien que théoriquement possibles, les homodimères Myc-Myc n'ont jamais été observés *in vivo*.

Les protéines N-Myc ont 38 % d'homologie de séquence avec c-Myc. L-Myc quant à elle a 33 % d'homologie avec c-Myc. Ces trois gènes homologues *c-MYC*, *N-MYC* et *L-MYC* sont conservés des poissons à l'Homme. Ce ne sont pourtant pas les seuls membres de la famille *MYC*. Deux autres gènes, *B-MYC* et *S-MYC*, ont été identifiés chez le rat.

e) *B-MYC* et *S-MYC* : les deux petits derniers

Le gène *B-MYC* a été identifié grâce à l'homologie de séquence avec la région N-terminale de *c-MYC* (Ingvarsson et al., 1988). La protéine *B-MYC* ne présente pas de domaine de dimérisation ni de fixation à l'ADN. De plus, elle a été décrite comme capable d'inhiber le pouvoir tumorigénique de c-Myc en coopération avec Ras dans des cellules embryonnaires de rat [Figure 10] (Resar et al., 1993).

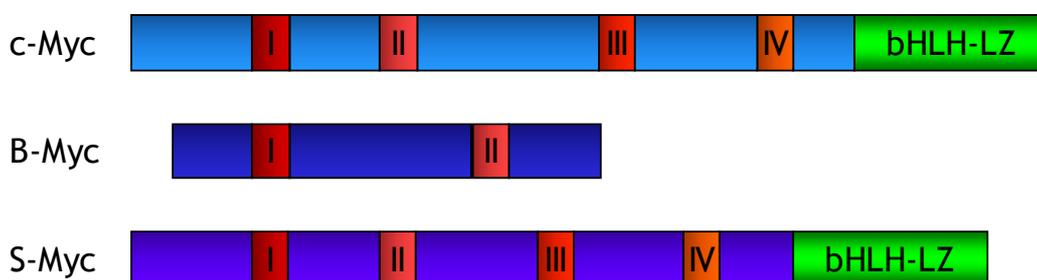


Figure 10 : Protéines B-Myc et S-Myc

Pour *S-MYC*, la séquence du gène est plus homologue avec *N-MYC* (Sugiyama et al., 1989). La protéine *S-MYC* n'a que 6 sur les 7 boîtes Myc présents chez les autres gènes *MYC* murins. De plus, Sugiyama et ses collaborateurs ont montré

qu'après transfection avec *S-MYC*, les cellules RT4-AC de rat perdent leur tumorigénicité chez la souris immunodéprimée. Il semblerait donc que le domaine *Boîte MYC* manquant chez *S-MYC* soit essentiel pour le potentiel tumoral des gènes *MYC*.

Il apparaît donc que *B-MYC* et *S-MYC*, parce qu'ils correspondent à des formes tronquées, auraient un rôle d'antagoniste des autres gènes *MYC*. Pour le moment, ces deux derniers membres, *B-MYC* et *S-MYC*, n'ont pas été mis en évidence chez l'Homme.

Depuis les années 80, l'étude des gènes *MYC* a permis de nombreuses avancées sur la régulation des gènes et la tumorigenèse. Néanmoins, bien que les protéines *Myc*, et plus particulièrement *c-MYC* soient encore aujourd'hui au cœur de nombreuses études, les fonctions physiologiques exactes de ces protéines demeurent méconnues.

Dans les prochains paragraphes, je vais m'attacher à mettre en évidence les éléments fonctionnels de ces protéines qui me paraissent les plus pertinents dans le cadre de mon travail.

2. Expression et régulation des gènes *MYC*

a) Profils d'expression des gènes *MYC*

(1) Développement embryonnaire

Les premières études de l'expression des gènes *c-MYC*, *N-MYC* et *L-MYC* ont été réalisées par hybridation *in situ* au cours du développement embryonnaire chez la souris.

L'expression de *c-MYC* a été décrite comme généralisée voire ubiquitaire. En effet, il est exprimé dans de nombreux tissus tels que le cartilage, le tissu adipeux brun, le thymus, le foie et l'intestin [Tableau 4]. En analysant l'état de prolifération des cellules, Hirning et ses collaborateurs ont montré que *c-MYC* n'est exprimé que dans les cellules en prolifération (Hirning et al., 1991).

Gène	Age	Tissu
<i>N-MYC</i>	Embryon	Cerveau, rétine, cristallin (Zimmerman <i>et al.</i> , 1986;Hirning <i>et al.</i> , 1991)
		Poumon (Zimmerman <i>et al.</i> , 1986;Mugrauer <i>et al.</i> , 1988;Hirning <i>et al.</i> , 1991)
		Bourgeon dentaire (Hirning <i>et al.</i> , 1991)
		Rein, intestin (Zimmerman <i>et al.</i> , 1986)
		Follicule pileux, rein, foie, SNC* (Mugrauer <i>et al.</i> , 1988)
	Cœur (Mugrauer <i>et al.</i> , 1988;Zimmerman <i>et al.</i> , 1986)	
Adulte	Cœur (Zimmerman <i>et al.</i> , 1986)	
<i>c-MYC</i>	Embryon	Tissu adipeux brun, thymus, foie, villosités intestinales, cartilage, poumon, bourgeon dentaire (Hirning <i>et al.</i> , 1991)
		Cerveau, rein, foie (Zimmerman <i>et al.</i> , 1986)
	Adulte	Surrénal, thymus, rate, intestin, poumon, cœur (Zimmerman <i>et al.</i> , 1986)
<i>L-MYC</i>	Embryon	Peau (Hirvonen <i>et al.</i> , 1990)
		Cerveau (Zimmerman <i>et al.</i> , 1986;Hirvonen <i>et al.</i> , 1990)
		Rein, Poumon (Zimmerman <i>et al.</i> , 1986;Hatton <i>et al.</i> , 1996)
	Adulte	Poumon (Zimmerman <i>et al.</i> , 1986)
*SNC = système nerveux central		

Tableau 4 : Profil d'expression des gènes *MYC*

L'expression des gènes *N-MYC* et *L-MYC* a également été observée dans plusieurs tissus embryonnaires [Tableau 4]. Le gène *L-MYC* est exprimé dans le cerveau, le rein, le poumon et la peau (Zimmerman *et al.*, 1986;Hirvonen *et al.*, 1990;Hatton *et al.*, 1996). Le gène *N-MYC* quant à lui est exprimé dans plusieurs tissus parmi lesquels le cerveau, le poumon et le rein (Zimmerman *et al.*, 1986;Mugrauer *et al.*, 1988;Hirning *et al.*, 1991).

Ces différents groupes ont montré qu'en comparaison avec *c-MYC*, dont l'expression paraît ubiquitaire, l'expression des gènes *N-MYC* et *L-MYC* était spécifique au niveau des tissus mais aussi au niveau des stades du développement (Zimmerman *et al.*, 1986;Mugrauer *et al.*, 1988;Hirning *et al.*, 1991). Par exemple, dans la crête neurale, *N-MYC* est d'abord exprimé dans toutes les cellules, puis après la migration des cellules, l'expression de *N-MYC* est restreinte aux cellules qui subissent une différenciation neuronale (Wakamatsu *et al.*, 1997).

Par ailleurs, Hirning et ses collaborateurs ont également mis en évidence le maintien de l'expression de *N-MYC* durant les premières étapes de la différenciation dans le cerveau, la rétine, le cristallin, et l'intestin (Hirning *et al.*, 1991). L'expression de *N-MYC* serait donc caractéristique des premières étapes de la différenciation.

Enfin, dans le poumon et le bourgeon dentaire, les gènes *N-MYC* et *c-MYC* ont des profils d'expression complémentaires (Hurlin *et al.*, 1997). En effet, il apparaît que là où *c-MYC* est exprimé, *N-MYC* ne l'est pas et inversement.

(2) Chez l'adulte

L'expression des gènes *MYC* semble quasi restreinte au développement embryonnaire. Néanmoins, le gène *c-MYC* n'est exprimé que dans les cellules en cours de prolifération de certains tissus comme par exemple dans les villosités intestinales [Tableau 4] (Zimmerman *et al.*, 1986; Hirning *et al.*, 1991). En revanche, il n'est pas exprimé dans les cellules quiescentes. Les gènes *N-MYC* et *L-MYC* quant à eux ne sont normalement pas exprimés chez l'adulte à l'exception d'une faible expression dans le poumon pour *L-MYC* et le cerveau, le cœur, les testicules ainsi que dans les cellules pré-B pour *N-MYC* (Zimmerman *et al.*, 1986).

La dérégulation de l'expression des gènes *MYC* par augmentation de l'expression ou la levée de sa répression est presque toujours liée au processus tumoral. C'est notamment le cas avec la surexpression de *c-MYC* dans le colon qui participe à la tumorigenèse du cancer du colon (Erisman *et al.*, 1985) ou *N-MYC* et le neuroblastome.

b) Régulation de l'expression des gènes *MYC*

Les gènes *MYC* sont essentiels pour le développement embryonnaire et leur dérégulation peut être dramatique pour la cellule et pour l'organisme. Ceci suggère que leur expression doit être finement régulée pour permettre

l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Plusieurs groupes ont donc cherché à identifier les mécanismes de régulation de l'expression des gènes *MYC*.

Comme pour d'autres gènes, la régulation de l'expression des gènes *MYC* peut se faire à plusieurs niveaux notamment transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel.

Tout d'abord, la transcription des gènes *MYC* est sensible à différents facteurs. Certaines protéines telles que l'interleukine 7 induisent l'expression des gènes *c-MYC* et *N-MYC* (Morrow et al., 1992). A l'inverse, le TGF β (via les protéines SMAD) semble inhiber la transcription de *c-MYC* et *N-MYC* (Pietenpol et al., 1990; Yagi et al., 2002; Serra et al., 1994).

Avec une demi-vie d'environ 10 min, les transcrits *MYC* sont peu stables (Dani et al., 1984). De plus, les ARNm *MYC* contiennent des *Internal Ribosomal Entry Sequences* » IRES (Stoneley et al., 1998; Jopling and Willis, 2001; Jopling et al., 2004). Les IRES sont des structures secondaires qui permettent une entrée directe des ribosomes pour la traduction. Grâce à leur IRES, les ARNm *MYC* peuvent être traduits alors même que la synthèse protéique CAP-dépendante est inhibée comme c'est le cas par exemple lors d'un arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

Il a par ailleurs été montré que l'IRES du gène *N-MYC* permet une traduction jusqu'à 7 fois plus importante par rapport à celle de *c-MYC* dans les lignées de neuroblastome et des précurseurs neuronaux (Jopling and Willis, 2001).

Les protéines Myc sont peu stables. En effet, leur demi-vie ne dépasse guère 30 minutes (Ramsay et al., 1984). Les modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation ou ubiquitinylation) des protéines Myc peuvent donc jouer un rôle majeur pour la régulation de l'expression des gènes *MYC* en modifiant l'activité et/ou la stabilité des protéines Myc. Par exemple, la phosphorylation de la sérine 62 permet la stabilisation de la protéine c-Myc, tandis que la phosphorylation de la thréonine 58 est requise pour l'ubiquitinylation et la dégradation de c-Myc (Yeh et al., 2004). Ainsi la stabilité de la protéine va dépendre de la somme des différentes modifications post-traductionnelles qu'elle va avoir.

Par ailleurs, le site de liaison de la protéine Miz1 est dans la partie C-terminale de c-Myc. Or, lorsque c-Myc est co-exprimée avec Miz1 par transfection transitoire, la demi-vie de c-Myc est significativement prolongée en présence de Miz1 (Salghetti et al., 1999). Il semblerait qu'en interagissant avec c-Myc, Miz1 masquerait un site qui normalement diminue la stabilité de c-Myc (Salghetti *et al.*, 1999). Cette stabilisation de c-Myc par Miz1 pourrait ainsi renforcer la régulation par les couples c-Myc/Miz1.

3. Les gènes *MYC* : propriétés et fonctions

a) Facteurs de transcription

(1) Le couple *Myc-Max* au cœur du réseau *Myc/Mad/Max*

Les protéines *Myc* présentent une grande affinité pour former des hétérodimères avec la protéine *Max* (Blackwood and Eisenman, 1991). La protéine *Max* s'apparente aux protéines *Myc* déléetées de leur domaine de transactivation. La protéine *Max* peut également former des homodimères *Max-Max* ou des hétérodimères avec une protéine *Mad* formant ainsi un complexe *Mad-Max*. Tout comme *Myc* et *Max*, les protéines *Mad* appartiennent à la famille des protéines bHLH-LZ. La protéine *Max* joue le rôle de pivot central du réseau *Myc/Max/Mad*.

La protéine *Max* est exprimée de manière constitutive. De plus, elle est plus stable et en excès par rapport aux protéines *Myc* et *Mad* (Blackwood et al., 1992). La formation des hétérodimères *Myc-Max* ou *Mad-Max* dépend donc de la quantité de protéines *Myc* et *Mad* et du rapport entre les deux. Ainsi, dans les cellules en cours de prolifération où *MYC* est plus exprimé que *Mad*, les couples *Myc-Max* prédominent. En revanche, dans les cellules quiescentes ce sont les complexes *Mad-Max* qui sont majoritaires puisque les protéines *Mad* y sont plus exprimées que les protéines *Myc* (Ayer and Eisenman, 1993). Ces observations indiquent également que la régulation de l'activité des complexes *Myc-Max* et *Mad-Max* correspond à celle des protéines *Myc* et *Mad*.

Les complexes *Myc-Max*, ainsi que *Max-Max* et *Mad-Max*, peuvent ensuite se fixer à l'ADN sur des séquences spécifiques CANNTG (préférentiellement CACGTG)

appelées les boîtes E. (Blackwell et al., 1990; Blackwood and Eisenman, 1991). La spécificité de cette liaison est due à la structure en « pince » que forment les deux domaines bHLH-LZ rapprochés lors de la dimérisation [Figure 11] (Nair and Burley, 2003).

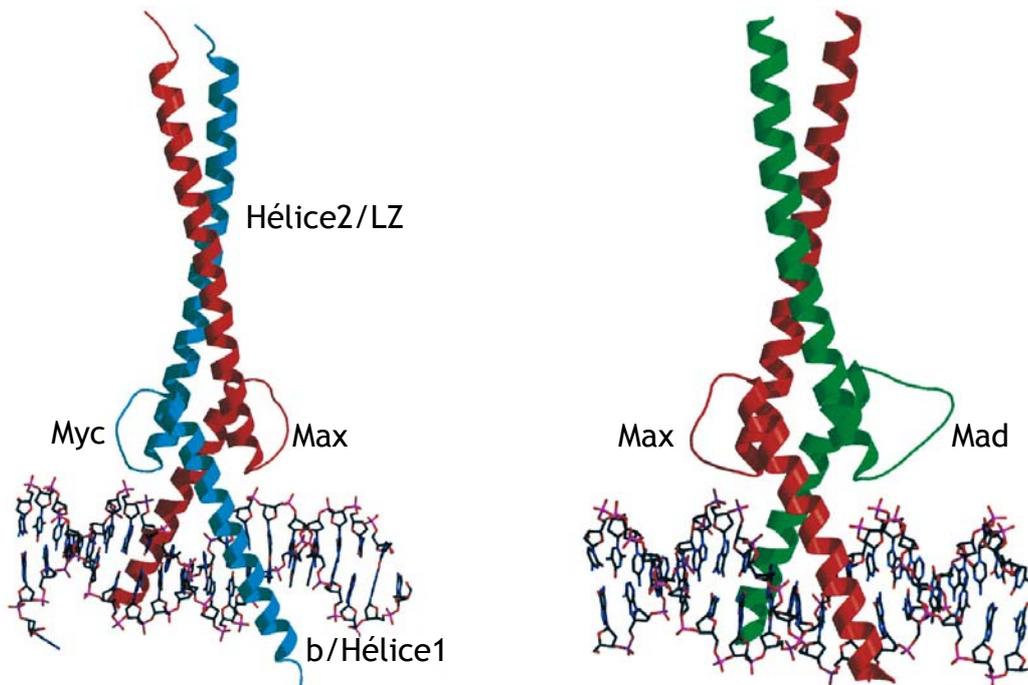


Figure 11 : Structure des couples Myc-Max et Mad-Max sur les boîtes E
Schéma représentant la structure cristallographique des domaines bHLH-LZ des couples Myc-Max et Mad-Max fixés à une boîte E. En rouge Max, en bleu Myc, en vert Mad. Figure adaptée de Nair and Burley, 2003.

Il est généralement admis que les complexes Myc-Max vont activer la transcription des gènes possédant des boîtes E dans leur promoteur tandis que les hétérodimères Mad-Max vont réprimer l'expression de ces mêmes gènes (Grandori et al., 2000; Baudino et al., 2002). La régulation de l'expression des gènes cibles se fait grâce à la modification de l'équilibre entre les hétérodimères Myc-Max et Mad-Max.

La formation d'hétérodimères Myc-Max permet d'initier l'interaction avec d'autres partenaires des protéines Myc nécessaires à leur fonction d'activateur transcriptionnel par ouverture de la chromatine [Figure 12] :

(i)- Interaction avec la protéine TRRAP au niveau du domaine MBII permettant le recrutement de deux complexes à activité Histone Acétyltransférase (HAT), GCN5

et TIP60 capables d'acétyler les histones H3 et H4 (McMahon et al., 2000; Frank et al., 2003) ;

(ii)- Recrutement direct des protéines TIP48 et TIP49 appartenant au complexe TIP60 sur les protéines Myc (Wood et al., 2000) ;

(iii)- Interaction via la partie C-terminale avec les complexes CBP/p300 présentant une activité HAT (Vervoorts et al., 2003).

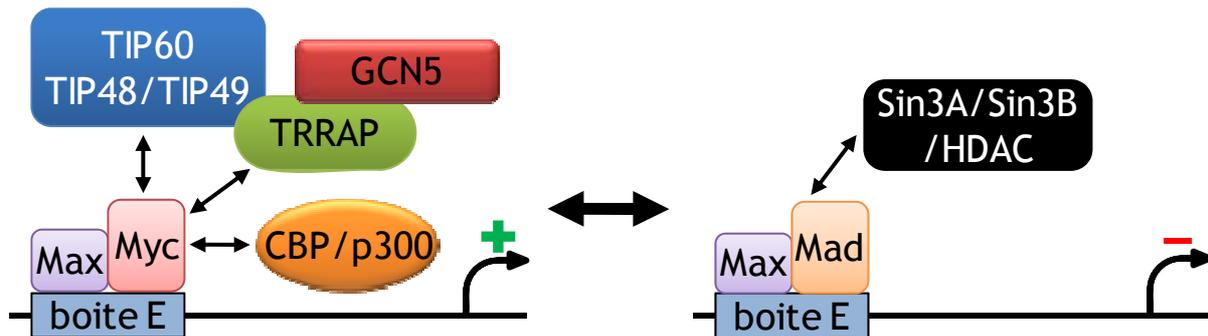


Figure 12 : Régulation transcriptionnelle par Myc/Mad/Max

Les hétérodimères Myc-Max ou Mad-Max se fixent à l'ADN sur les boîtes E et activent ou répriment l'expression de gènes cibles.

A l'inverse, lorsqu'ils se fixent sur les boîtes E, les hétérodimères Mad-Max vont recruter, via les protéines Sin3A et Sin3B, les complexes répresseurs N-CoR et les Histones Déacétylases HDAC1 et HDAC2 [Figure 12] (Schreiber-Agus and DePinho, 1998). L'interaction des hétérodimères Mad-Max avec ces différents complexes va réprimer l'expression des gènes cibles.

(2) Répresseur transcriptionnel via Miz1

Au delà de leur fonction d'activateur de la transcription via les complexes Myc-Max, les protéines Myc sont capables de réprimer l'expression de gènes par interaction avec la protéine à domaine POZ - doigt de zinc *Msx-interacting zing finger* (Miz1) au niveau d'une séquence *Initiator element* (INR) [Figure 13] (Li et al., 1994; Peukert et al., 1997). L'élément INR qui a pour séquence consensus YYCAYYYYY (Y représentant une base pyrimidique Thymine ou Cytosine) sert également à l'activation transcriptionnelle par Miz1 en l'absence d'interaction avec Myc (Peukert *et al.*, 1997).

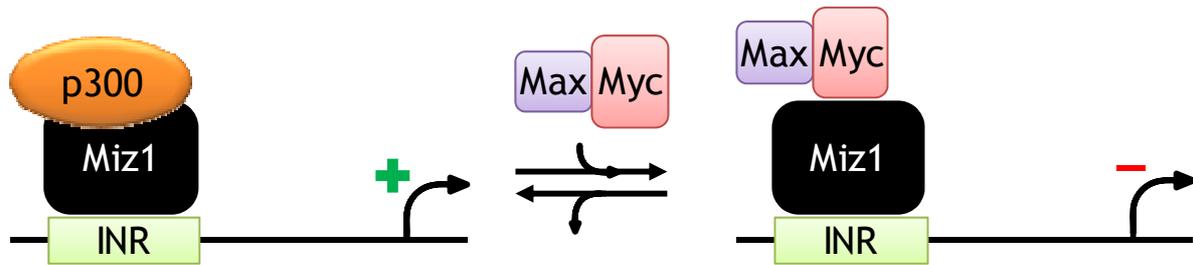


Figure 13 : Répression transcriptionnelle via Miz1

La protéine Miz1 active la transcription de ses gènes cibles portant une séquence INR. En interagissant avec Miz1, les couples Myc-Max sont recrutés aux sites INR et répriment l'expression des gènes.

(3) Gènes cibles des protéines Myc

Plus de 25000 boîtes E ont été identifiées dans le génome humain (Cawley et al., 2004). Sachant qu'un gène peut avoir plusieurs boîtes E, les protéines Myc seraient capables de réguler l'expression de plus de 11 % des gènes humains (Fernandez et al., 2003). Toutefois, comparées à celles d'autres facteurs de transcription, les modulations d'expression induites par les protéines Myc sont plus faibles (1,5 à 2 fois). Ainsi, il existe très probablement de nombreuses cibles non identifiées.

(4) Les microARN, de nouvelles cibles des protéines Myc

Les micro-ARN (miARN) sont de petits ARN non codants identifiés comme des éléments clés de la régulation de l'expression des gènes. Depuis leur découverte chez le nématode *Caenorhabditis elegans* en 1993, des études ont révélé, chez l'Homme, la présence de plus de 500 miARN pouvant cibler potentiellement près de 30 % des ARNm humains (Lee et al., 1993; Lewis et al., 2005).

Les miARN sont des petits ARN de 18 à 24 nucléotides de longueur qui peuvent se lier à une ou plusieurs séquences cible de différents transcrits (Bartel, 2004). En se liant, ils recrutent le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) vers l'ARNm. Il est admis que si la complémentarité entre le miARN et sa cible est parfaite, l'ARNm est dégradé. En revanche, si la complémentarité est imparfaite, une répression de la traduction de l'ARNm cible est généralement observée.

Les gènes *MYC* étant capables de réguler l'expression de nombreux gènes par divers mécanismes, plusieurs groupes ont cherché à mettre en évidence la contribution des miARN. Différentes études ont permis de montrer que les gènes *MYC* pouvaient réguler l'expression de différents miARN définissant ainsi une nouvelle classe de cibles des gènes *MYC*. Il a d'abord été montré que le gène *c-MYC* induit l'expression du miARN polycistronique miR-17-92 (He et al., 2005; O'Donnell et al., 2005). Ce locus miR-17-92 code pour six miARN (miR-17-5, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b, et miR-92) qui interviennent dans la régulation de l'apoptose notamment par répression de l'expression du gène pro-apoptotique BIM (He et al., 2005; Mendell, 2005; O'Donnell et al., 2005; Ventura et al., 2008; Xiao et al., 2008; Koralov et al., 2008).

En parallèle, il a été montré que *c-MYC* réprime également l'expression de miARN suppresseurs de tumeurs, comme let-7, miR-29, miR-34, miR-15/16 ou miR-23a/b (O'Donnell et al., 2005; Chang et al., 2008; Sampson et al., 2007; Gao et al., 2009).

Ainsi, la surexpression des gènes *MYC* pourrait conduire à une dérégulation des miRNA dont mes conséquences seraient, comme pour les gènes suppresseurs de tumeurs et les oncogènes eux-mêmes, une surexpression de miARN à propriétés pro-oncogéniques et une diminution de l'expression de miARN suppresseurs de tumeurs.

Par la suite, Lin et ses collaborateurs ont identifié plusieurs nouveaux miARN réprimés (miR-181 et miR-338) ou activés (miR-141, miR-200 et miR-429) par *c-MYC* qui seraient impliqués dans l'inhibition de la différenciation induite par *c-MYC* dans les cellules souches (Lin et al., 2009). Ces résultats suggèrent que les miARN qui étaient jusqu'à présent identifiés comme pouvant intervenir dans des voies de signalisation chez l'adulte et lors de la transformation tumorale peuvent également intervenir dans des processus liés au développement (inhibition de la différenciation, dédifférenciation). Ces miARN identifiés par Lin et ses collaborateurs pourraient par conséquent également intervenir le processus de reprogrammation cellulaire induit par l'oncogène *c-MYC* en combinaison avec les

gènes *OCT3/4*, *SOX2* et *KLF4* (Okita et al., 2007;Takahashi et al., 2007;Wernig et al., 2007;Hanna et al., 2008).

Enfin, il a également été montré que l'expression des gènes *MYC* pouvait être régulée par des miARN. C'est ainsi le cas du miARN let-7 qui réprime l'expression de *c-MYC* dans les lymphomes de Burkitt (Sampson et al., 2007). Par ailleurs, étant donné que let-7 est lui-même régulé par des cibles de *c-MYC*, l'oncogène *c-MYC* pourrait être un élément de régulation clé de plusieurs miARN de la tumorigenèse (Chang et al., 2008). Encore une fois, l'exemple de ce miARN let-7 met en évidence l'importance des boucles de rétro-contrôle dans lesquelles interviennent les facteurs Myc.

Une dérégulation globale des miARN pourrait rendre compte du processus tumoral et de la dérégulation des gènes eux-mêmes, des voies de signalisations, mais également de l'état de différenciation de la cellule tumorale. Ainsi, l'étude de la dérégulation des miARN pourrait représenter une alternative à la recherche de nouveaux marqueurs moléculaires.

b) Inducteurs de la croissance et du cycle cellulaire

Une des premières fonctions des gènes *MYC* est leur capacité à promouvoir le cycle cellulaire (Roussel et al., 1991). Il a été montré que la protéine c-Myc était essentielle pour la transition G1-S du cycle cellulaire [Figure 14] (Mateyak et al., 1997). En effet, les protéines Myc induisent l'expression des gènes *CDK4* et *CCND2* (cycline D2) (Bouchard et al., 1999;Hermeking et al., 2000). Ces complexes cycline D-CDK4 séquestrent la protéine KIP1, inhibiteur des *Cyclin-Dependent Kinase* (CDK) et permettent ainsi la libération et l'activation des complexes cycline E-CDK2 indispensables pour la progression du cycle cellulaire (Bouchard *et al.*, 1999).

Et de manière plus générale, les protéines Myc peuvent induire l'expression des cyclines D1, E1 et A2 ainsi que les protéines *CDC25A*, *E2F1*, *E2F2*... (Meyer and Penn, 2008).

De plus, il a été montré que les complexes Myc-Max pouvaient interagir avec Miz1 pour réprimer l'expression des gènes *INK4B* et *p21^{Cip1/Waf1}* qui sont impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire [Figure 14] (Staller et al., 2001).

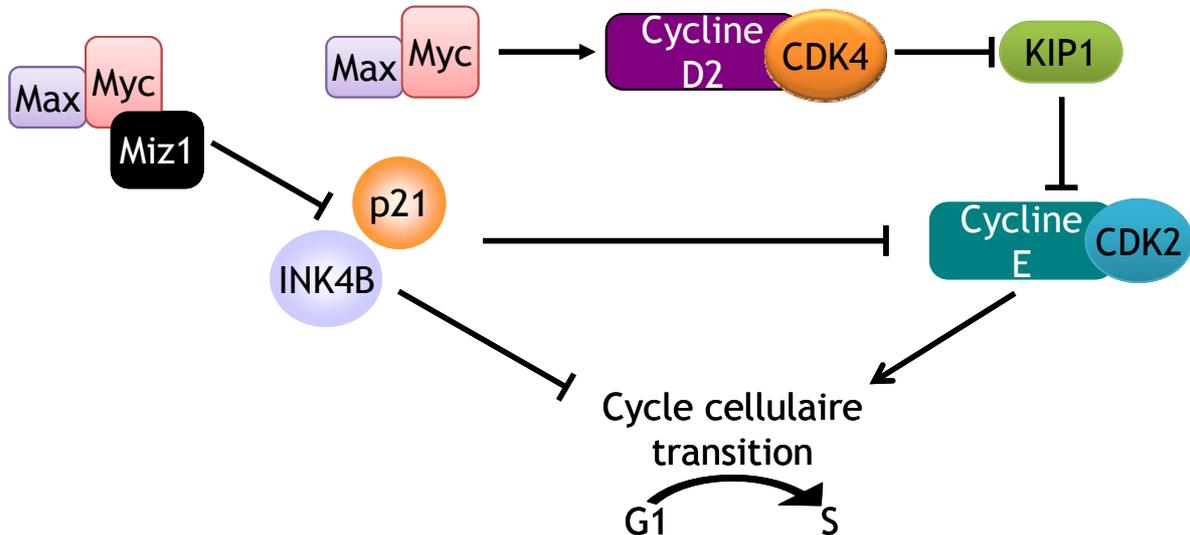


Figure 14 : Les protéines Myc induisent la prolifération cellulaire

Par ailleurs, les protéines Myc jouent également un rôle direct dans la croissance cellulaire. En effet, il a été montré que les lymphocytes B présentaient une croissance cellulaire sans progression du cycle chez la souris transgénique *Eμ-MYC* mais également dans des cellules humaines surexprimant *c-MYC* (Iritani and Eisenman, 1999; Beier et al., 2000; Schuhmacher et al., 1999). Cette action passerait par l'activation de l'ARN polymérase III responsable de la synthèse des ARN de transfert et de l'ARN ribosomal 5S qui sont requis pour la synthèse protéique dans les cellules en phase de croissance (Gomez-Roman et al., 2003).

c) Inducteurs de l'apoptose

La surexpression des gènes *MYC* induit une mort cellulaire programmée, ou apoptose, dépendante de la protéine p53 sauvage (Hermeking and Eick, 1994; Wagner et al., 1994). Il s'agit d'un mécanisme de protection cellulaire contre les dommages liés à une prolifération anarchique ou à un stress oncogénique [Figure 15]. Cette apoptose passe par la protéine ARF qui est un inhibiteur du gène *MDM2*, E3 ubiquitine ligase responsable de la dégradation de p53 (Zindy et al., 1998; Brooks and Gu, 2006). De plus, les protéines Myc peuvent également

directement induire l'expression de p53 (Reisman et al., 1993). Le blocage de la dégradation de p53 par le protéasome et l'augmentation de son expression permettent son accumulation et l'induction de gènes cibles dont Bax, Puma, Noxa, Bim effecteurs de l'apoptose (Benchimol, 2001).

Bien que la voie ARF-MDM2-p53 ait un rôle prépondérant dans le potentiel apoptotique des gènes *MYC*, la surexpression des protéines Myc peut également induire l'apoptose en modifiant l'équilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotiques [Figure 15]. Par exemple, Eischen et ses collaborateurs ont montré que la surexpression de *c-MYC* induit indirectement une inhibition de la transcription de la protéine anti-apoptotique Bcl-XL dans des cellules myéloïdes primaires (Eischen et al., 2001).

Enfin, il a été montré que *c-MYC* favorise l'oligomérisation des protéines Bax et la formation de pores au niveau de la membrane des mitochondries (Annis et al., 2005). Ceci permet donc la libération du cytochrome c qui est une étape essentielle pour le programme apoptotique.

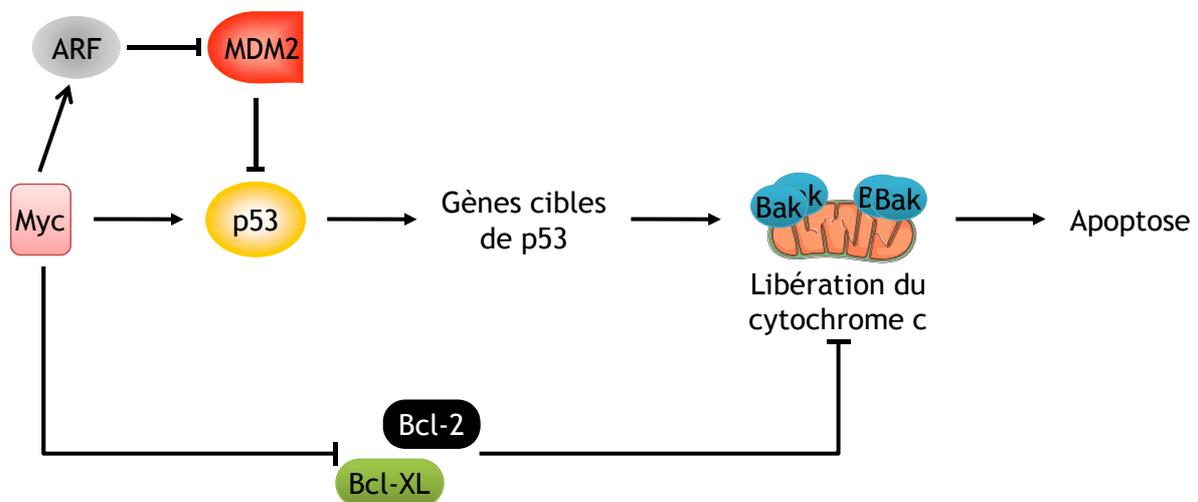


Figure 15 : Induction de l'apoptose par Myc

Les protéines Myc peuvent induire l'expression ou l'activité des initiateurs et effecteurs de l'apoptose et inhiber l'expression des protéines anti-apoptotiques.

d) Acteurs du développement

Afin de déterminer leur rôle respectif au cours du développement embryonnaire, des expériences de knock-out des gènes *c-MYC*, *N-MYC* ou *L-MYC* ont donc été réalisées chez la souris.

Le groupe de Bradley a mis en évidence la létalité précoce, J9.5-J10.5, des souris knocked-out (KO) pour le gène *c-MYC* (Davis et al., 1993). Des travaux similaires ont montré que le KO du gène *N-MYC* chez la souris est aussi létal, J10.5-J11.5, durant le développement embryonnaire (Sawai et al., 1991; Charron et al., 1992; Stanton et al., 1992). En revanche, le knock-out du gène *L-MYC* n'est pas létal et les souris ne présentent pas de phénotype remarquable. Ainsi, il apparaît que les gènes *c-MYC* et *N-MYC* sont essentiels pour le développement normal de la souris et qu'un des deux ou les deux sont capables de compenser l'absence d'expression du gène *L-MYC*.

L'analyse des embryons de souris KO pour les gènes *c-MYC* ou *N-MYC* a mis en évidence les rôles de ces deux gènes dans l'organogénèse de différents tissus. Ainsi, Stanton et ses collaborateurs ont suggéré que le gène *N-MYC* est indispensable au développement du mésonéphros (rein), de l'intestin, du poumon et du système nerveux central (Stanton *et al.*, 1992).

Pour étayer le rôle du gène *N-MYC* dans le développement embryonnaire, le groupe de Rossant a étudié une mutation du gène *N-MYC* conduisant à une expression partielle du gène (Moens et al., 1992). Ils ont montré que les souris porteuses de cette mutation meurent à la naissance par asphyxie. Cette dernière est due à un défaut de formation de l'épithélium pulmonaire. Ces résultats suggèrent qu'au-delà de l'expression des gènes *MYC*, leur niveau d'expression est aussi primordial pour leur développement.

Chez l'Homme, le syndrome de Feingold a été associé à un déficit ou à la perte d'expression de *N-MYC* (van Bokhoven et al., 2005). Ce syndrome se caractérise par des difficultés d'apprentissages accompagnées d'un retard mental ainsi que par des malformations (microcéphalies, atrésies œsophagiennes et/ou duodénales, malformations du cœur, du visage, des pieds et des mains) (Courtens et al., 1997). Ce syndrome lié à une mutation du gène *N-MYC* prolonge ainsi les observations faites chez la souris concernant le rôle essentiel de *N-MYC* dans le développement embryonnaire (van Bokhoven *et al.*, 2005).

e) Inhibiteurs de la différenciation

A partir des études sur le rôle des gènes *MYC* dans le développement embryonnaire, plusieurs groupes se sont intéressés à la fonction des gènes *MYC* dans la différenciation.

Concernant le gène *c-MYC*, Freytag et Geddes ont montré que la surexpression de *c-MYC* dans des adipoblastes inhibe l'expression du gène C/EBP ce qui bloque la différenciation terminale de ces cellules (Freytag and Geddes, 1992). Le gène *L-MYC* a également été impliqué dans l'inhibition de la différenciation des cellules du cristallin au cours du développement embryonnaire (Morgenbesser et al., 1995).

Quant à *N-MYC*, Knoepfler et ses collaborateurs ont mis évidence la différenciation précoce et une moindre prolifération des progéniteurs neuronaux issus de souris KO pour le gène *N-MYC* en comparaison des mêmes cellules de souris sauvages (Knoepfler et al., 2002).

L'ensemble de ces études montre que les gènes *MYC* sont des inhibiteurs de la différenciation cellulaire et que l'inhibition de leur expression accélère la différenciation.

f) Les gènes *MYC* et les cellules souches

Le domaine de cellules souches normales et cancéreuses est l'objet d'attentions grandissantes. De nombreux travaux ont été menés pour étudier le rôle des gènes *MYC* dans la régulation et les fonctions des cellules souches ou progénitrices.

Cartwright et ses collaborateurs ont tout d'abord mis en évidence que le maintien de l'expression du gène *c-MYC* dans des cellules souches embryonnaires murines permet à ces dernières de maintenir leurs propriétés d'auto-renouvellement (Cartwright et al., 2005).

Par la suite, d'autres groupes se sont intéressés au potentiel de *c-MYC* pour le maintien des propriétés de cellules souches. Récemment, il a été montré que *c-MYC* fait partie de la combinaison minimum de gènes avec *OCT3/4*, *SOX2* et *KLF4* nécessaire à la reprogrammation d'un fibroblaste différencié en cellule souche pluripotente induite (iPS cell = induced Pluripotent Stem cell) (Okita et al.,

2007;Takahashi et al., 2007;Wernig et al., 2007;Hanna et al., 2008). Ces cellules « reprogrammées » présentent des similarités avec les cellules souches embryonnaires notamment morphologique et de potentiel de croissance (Takahashi *et al.*, 2007). Elles présentent également les mêmes profils épigénétiques (méthylation de l'ADN et modifications de la chromatine) et d'expression génique (Wernig *et al.*, 2007;Hanna *et al.*, 2008).

Depuis, plusieurs groupes ont reproduit et élargi ces travaux à partir de différents types cellulaires. Il a été notamment montré que des lymphocytes B matures peuvent également être reprogrammés en cellules iPS grâce aux 4 gènes *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* et *c-MYC* (Hanna *et al.*, 2008).

4. Les gènes *MYC* : des oncogènes universels

La famille *MYC* est impliquée dans de nombreux cancers [Tableau 5] : neuroblastome, mélanome, cancers du poumon, du sein, de l'ovaire, du colon... (Nesbit et al., 1999;Dang, 1999). Près de la moitié des cancers présentent une dérégulation d'un gène de la famille *MYC*. Par conséquent, la dérégulation de l'expression des gènes *MYC* est l'un des principaux mécanismes de tumorigénèse.

L'activation oncogénique des gènes *MYC* est même au cœur du processus tumoral. En effet, elle détourne les différentes fonctions des gènes *MYC* pour les faire participer à toutes les principales étapes de l'oncogenèse [Figure 16] (Pelengaris et al., 2002) : prolifération cellulaire (Eilers et al., 1991) ; croissance cellulaire (Iritani and Eisenman, 1999) ; angiogenèse (Baudino *et al.*, 2002) ; différenciation cellulaire (Freytag and Geddes, 1992). Les protéines Myc sont également impliquées dans le processus métastatique (Pelengaris *et al.*, 2002) et l'instabilité génomique (Felsher and Bishop, 1999).

La dérégulation de l'expression du gène *c-MYC* dans les cancers peut être due à différents mécanismes dont les principaux sont les amplifications, les translocations chromosomiques ou les insertions virales (Nesbit *et al.*, 1999;Dang, 1999). En revanche, l'activation oncogénique de *L-MYC* ou *N-MYC* est le plus souvent due à une amplification du gène comme c'est le cas pour *L-MYC* dans le

cancer du poumon à petites cellules ou pour *N-MYC* dans le neuroblastome (Nau et al., 1985; Schwab et al., 1983).

Gène	Cancer	Dérégulation
<i>c-MYC</i>	Col de l'utérus	Amplification (Pinion et al., 1991)
	Colon	Amplification (Finley et al., 1989) Surexpression (Erisman <i>et al.</i> , 1985)
	Leucémie myéloïde	Amplification (Alitalo et al., 1985)
	Lymphome de Burkitt	Translocation (Dalla-Favera et al., 1982; Neel et al., 1982; Taub et al., 1982) Mutations ponctuelles (Bhatia et al., 1993)
	Lymphome non Burkitt	Translocation (Yano et al., 1992)
	Mélanome	Surexpression (Grover et al., 1996)
	Ovaire	Amplification (Wang et al., 1999)
	Poumon	Amplification (Little et al., 1983)
	Prostate	Amplification (Jenkins et al., 1997)
	Sein	Amplification (Escot et al., 1986) Surexpression (Escot et al., 1993)
<i>L-MYC</i>	Poumon	Amplification (Nau <i>et al.</i> , 1985)
<i>N-MYC</i>	Neuroblastome	Amplification (Schwab <i>et al.</i> , 1983)
	Poumon	Amplification/Surexpression (Nau <i>et al.</i> , 1986)
	Rétinoblastome	Amplification (Doz et al., 1996)
	Rhabdomyosarcome	Amplification (Driman et al., 1994)
	Sein	Surexpression (Mizukami et al., 1995)
	Thyroïde	Surexpression (Boulwood et al., 1988)

Tableau 5 : Oncogènes *MYC* dans les cancers

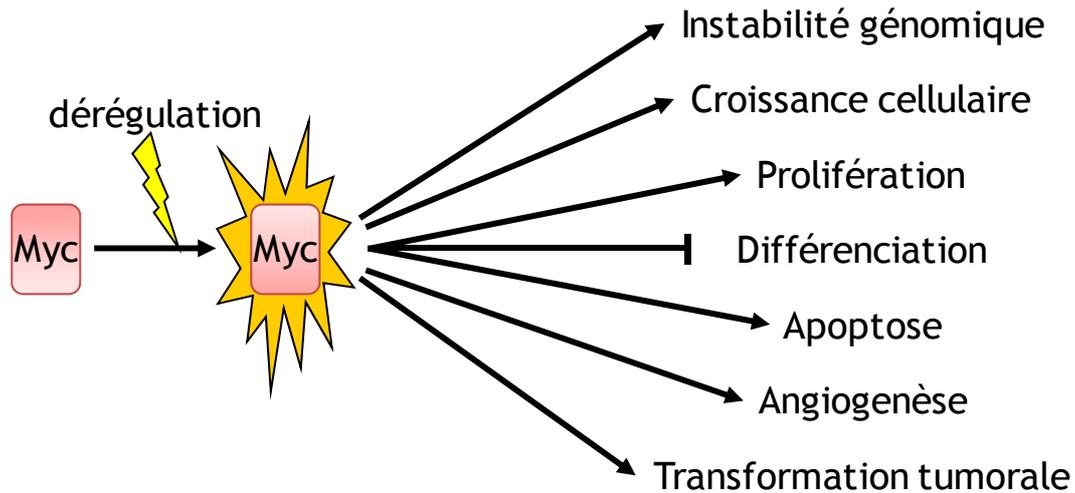


Figure 16 : *MYC*, un oncogène multifonction
Figure adaptée de Vita and Henriksson, 2006.

Pourtant dans certains cas, une surexpression des protéines Myc est observable sans qu'elle soit pour autant due à un de ces premiers mécanismes. C'est par exemple le cas dans certains neuroblastomes Simple Copie pour *N-MYC* qui présentent une forte expression de *N-MYC*. Cette dérégulation pourrait résulter de la stabilisation du transcrite ou de la protéine dont l'expression et la demi-vie sont normalement finement régulés.

Nous avons vu précédemment que la phosphorylation de la protéine c-Myc sur la Thréonine 58 induit la dégradation de la protéine (Yeh *et al.*, 2004). Or, plusieurs mutations dans la région flanquante de ce codon ont été observées dans les lymphomes de Burkitt (Bhatia *et al.*, 1993; Axelson *et al.*, 1995). Ces mutations pourraient empêcher la phosphorylation et donc stabiliser la protéine c-Myc. Ceci aurait pour conséquence de déréguler d'avantage le gène *c-MYC* qui est déjà surexprimé suite à une translocation chromosomique (Gaidano *et al.*, 1991; Bhatia *et al.*, 1993).

Malgré les différentes propriétés oncogéniques des gènes *MYC*, leur surexpression induit l'apoptose des cellules principalement médiée par la voie ARF-MDM2-p53. Par conséquent, la surexpression des gènes *MYC* seule ne suffit pas pour le processus tumoral. Dès lors, pour transformer les cellules, les gènes *MYC* doivent coopérer avec d'autres oncogènes capables d'agir comme facteur de survie en

inhibant la voie ARF-MDM2-p53. C'est notamment le cas de *RAS*, de *BMI1*, *TWIST1* et *TWIST2* (*DERMO1*) (Land et al., 1983;van Lohuizen et al., 1991;Maestro et al., 1999;Valsesia-Wittmann *et al.*, 2004).

C. La famille *TWIST*

1. Les gènes *TWIST*

La famille des gènes *TWIST* est conservée chez les métazoaires depuis la méduse « jellyfish » jusqu'aux mammifères (Germanguz et al., 2007). Les gènes *TWIST* sont des gènes du développement embryonnaire. Ils codent pour des facteurs de transcription nucléaires à domaine bHLH grâce auquel ils peuvent former des hétérodimères avec d'autres protéines à domaine bHLH dont les protéines E (Leptin, 1991; Wolf et al., 1991; Chen and Behringer, 1995; Li et al., 1995; Lee et al., 1999; Lee et al., 2000). Chez les vertébrés, les gènes *TWIST* les mieux caractérisés sont chez l'Homme et la souris, chacune de ces deux espèces porte les deux gènes paralogues *TWIST1* et *TWIST2*.

Le gène *TWIST1* humain est sur le chromosome 7q21 (Bourgeois et al., 1996). Il a été identifié par homologie de séquence avec le gène *TWIST1* murin (Lee *et al.*, 2000). Il code pour une protéine de 202 aa d'environ 25 kDa (Lee *et al.*, 2000).

Le gène *TWIST2* ou *DERMO1* est quant à lui situé en 2q37.3 (Perrin-Schmitt et al., 1997). Le gène *TWIST2* humain présente une forte homologie avec ceux de la souris (98,8 %) et du poulet (95 %) (Lee *et al.*, 2000; Scaal et al., 2001). Il code pour une protéine de 160 aa dont le poids moléculaire est d'environ 20 kDa (Lee *et al.*, 2000). La protéine Twist2 a été isolée par un crible double hybride chez la levure grâce à son interaction avec le domaine bHLH de la protéine E12 (Li *et al.*, 1995). Li et ses collaborateurs ont également mis en évidence la fixation de Twist2 aux boîtes E sous la forme de dimère avec E12.

a) Structure

L'alignement des gènes *TWIST1* et *TWIST2* chez différentes espèces montre une organisation génique conservée (Gitelman, 2007). Les gènes *TWIST1* contiennent deux exons. Le 1^{er} exon contient toute la région codante flanquée par le 5'UTR et un fragment du 3'UTR (environ 35 pb). Et le reste du 3'UTR se retrouve dans le 2^{ème} exon (Gitelman, 2007).

Pour *TWIST2*, l'organisation est similaire à l'exception du *TWIST2* humain. En effet, ce dernier possède 4 exons. Les trois derniers exons peuvent être utilisés

comme 2^{ème} exon. Il existe ainsi trois transcrits qui diffèrent au niveau du 3'UTR pour le gène *TWIST2* humain (Gitelman, 2007).

Au niveau de l'organisation génique, la principale différence entre les gènes *TWIST1* et *TWIST2* vient du fait que pour *TWIST1* l'intron fait 400 à 600 pb en fonction de l'espèce tandis que pour *TWIST2* il est 5 à 150 fois plus long (Lee *et al.*, 2000;Gitelman, 2007). Chez l'Homme, le gène *TWIST2* a ainsi une taille de plus de 40 kb pour un transcrit de 1,4 kb après maturation et épissage.

La séquence codante des gènes *TWIST* est organisée en deux régions : la partie N-terminale et la partie C-terminale contenant le domaine bHLH et la *TWIST* Box [Figure 17].

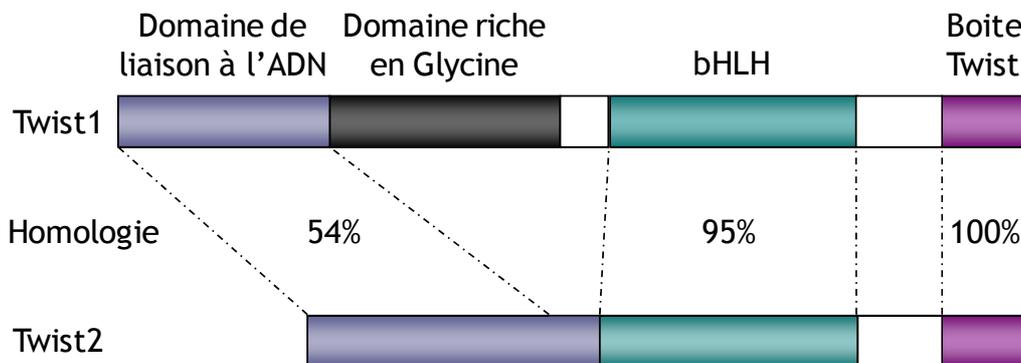


Figure 17 : Les protéines Twist1 et Twist2 chez l'Homme

Les protéines Twist présentent une forte homologie dans le domaine C-terminal. Twist1 possède en N-terminale une région riche en glycine absente chez Twist2.

Dans la partie N-terminale, les protéines Twist1 possèdent un domaine riche en résidus Glycine qui est absent chez Twist2. Malgré cette différence, les domaines N-terminaux de Twist1 et Twist2 présentent 54 % d'homologie de séquence (Li *et al.*, 1995). La partie N-terminale de Twist2 permet notamment l'interaction avec les complexes PCAF et p300 et l'inhibition de leur activité Histone Acétyltransférase (Hamamori *et al.*, 1999). Elle participe ainsi à la fonction de répresseur transcriptionnel de Twist2.

C'est au niveau de la partie C-terminale (bHLH et boite Twist) que les protéines Twist sont les plus homologues : 90 % (Li *et al.*, 1995). La boite Twist est un domaine spécifique aux protéines Twist [Figure 17] (Bialek *et al.*, 2004). Elle leur permet notamment de se fixer au domaine de liaison à l'ADN de la protéine

Runx2. Ce dernier se retrouve masqué et ne permet plus à Runx2 de se fixer à l'ADN pour induire la différenciation ostéogénique (Bialek *et al.*, 2004).

Le domaine bHLH est très important puisqu'il est indispensable pour la dimérisation des protéines Twist et leur fixation à l'ADN sur les boîtes E. Il intervient pour certaines de leurs fonctions dont l'inhibition de la myogenèse par répression de la protéine MyoD (Gong and Li, 2002).

C'est pourquoi la famille des protéines Twist est définie à partir du domaine bHLH : si le domaine bHLH d'une protéine présente plus de 89 % d'homologie avec celui d'un membre de la famille Twist, la protéine est considérée comme faisant partie de cette famille (Gitelman, 2007).

Chez l'Homme, les bHLH de Twist1 et de Twist2 ont une forte homologie, ils ne diffèrent que de 5 acides aminés ce qui met en évidence l'importance structurelle et fonctionnelle de ce domaine (Lee *et al.*, 2000). Néanmoins, cette différence permettrait, grâce à la fixation à des boîtes E cibles différentes, la spécificité fonctionnelle de Twist1 vis-à-vis de Twist2, et inversement (Li *et al.*, 1995).

b) Les gènes *TWIST* chez les autres espèces

La drosophile possède un seul gène *dTWIST*. Il est essentiel pour la gastrulation, la polarité dorso-ventrale ainsi que la différenciation du mésoderme et la formation des muscles (Thisse et al., 1987; Baylies and Bate, 1996). Par ailleurs, le gène *TWIST* tient son nom du phénotype « vrillé » (twisted) des embryons de drosophile dépourvus de *TWIST* (Thisse et al. 1987).

Chez les poissons, il peut y avoir jusqu'à 4 gènes *TWIST*. C'est le cas chez le poisson zèbre *Danio rerio* : *TWIST1a*, *TWIST1b*, *TWIST2* et *TWIST3*. Le gène *TWIST3* appartient à une nouvelle classe de *TWIST* présente chez les poissons mais aussi chez la grenouille et le poulet (Germanguz *et al.*, 2007). L'existence de ces 4 gènes serait due à deux premières duplications avant la séparation teleost-tétrapodes qui aurait abouti à 3 gènes *TWIST* (Gitelman, 2007; Gitelman, 2007). Ensuite, une ou plusieurs duplications ont pu se produire pour aboutir aux deux gènes *TWIST1a* et *TWIST1b* (Germanguz *et al.*, 2007).

c) De nouveaux membres dans la famille *TWIST*

Au-delà du groupe des gènes *TWIST*, la famille *TWIST* comprendrait d'autres gènes qui ont une forte homologie au niveau du domaine bHLH : *HAND1*, *HAND2*, *Paraxis* et *Scleraxis*. Tout comme les gènes *TWIST*, ce sont des facteurs de transcription nucléaires qui peuvent se dimériser et se fixer aux boîte E grâce à leur domaine bHLH.

Les gènes *Paraxis* et *Scleraxis* jouent un rôle dans le développement du mésoderme et la formation du squelette et des muscles (Burgess et al., 1995; Burgess et al., 1996; Cserjesi et al., 1995a). Chez l'Homme, *Scleraxis* a deux orthologues : *ScleraxisA* et *ScleraxisB*.

Les gènes *HAND1* et *HAND2* sont impliqués dans le développement des tissus extra-embryonnaires ainsi que dans celui du cœur et des dérivés des crêtes neurales (Cserjesi et al., 1995b; Cross et al., 1995; Hollenberg et al., 1995; Srivastava et al., 1995).

2. Profils d'expression

a) Embryogénèse

Chez la drosophile, le gène unique *dTWIST* est exprimé dès les premières heures de la gastrulation (Simpson, 1983; Thisse *et al.*, 1987). Chez les vertébrés, les gènes *TWIST1* et *TWIST2* présentent des profils d'expression similaires et qui se recouvrent dans certains tissus (Li *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2000) (Rose and Malcolm, 1997).

Les deux gènes *TWIST* sont exprimés à des stades de l'embryogénèse plus tardifs que chez la drosophile, après la fin de la gastrulation. L'expression des gènes *TWIST1* et *TWIST2* est observée dans plusieurs tissus dont la crête neurale, des dérivés des somites (sclérotome et dermatome), et les bourgeons de membres (Wolf et al., 1991; Chen and Behringer, 1995; Fuchtbauer, 1995; Li et al., 1995; Gitelman, 1997; O'Rourke et al., 2002).

Les gènes *TWIST1* et *TWIST2* ne sont pas exprimés dans le myotome (Li *et al.*, 1995). Ceci est un des premiers éléments suggérant que ces deux gènes chez

les vertébrés n'interviennent pas dans la formation des muscles contrairement au gène *TWIST* chez la drosophile (Chen and Behringer, 1995; Gitelman, 1997; Sobic et al., 2003).

Bien qu'il existe des recouvrements entre les profils d'expression des gènes *TWIST*, *TWIST2* est exprimé généralement plus tardivement que *TWIST1* dans le développement (Wolf *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1995).

L'étude du gène *TWIST1* chez la souris a mis en évidence son expression dans de nombreux tissus au cours de l'embryogénèse. *TWIST1* est exprimé de manière progressive à partir de J8.5 et atteint ses plus hauts niveaux d'expression à J9.5 dans les cellules de la crête neurale, des dérivés du mésoderme et les bourgeons de membres (Wolf *et al.*, 1991).

L'expression de *TWIST1* dans les cellules de la crête neurale se fait sous la forme d'un gradient correspondant à la migration cellulaire (Wolf et al., 1991; Chen and Behringer, 1995; Fuchtbauer, 1995; Gitelman, 1997; Ishii et al., 2003).

Le gène *TWIST1* est également exprimé dans les cellules immatures du futur crâne à partir de J12 (Bialek *et al.*, 2004). Son expression diminue par la suite avec la différenciation osseuse pendant la formation de la voûte et des sutures crâniennes (Rice et al., 2000; Connerney et al., 2006).

L'expression de *TWIST2* débute à partir de J10.5 et augmente progressivement dans des tissus dérivés du mésoderme et de l'ectoderme : sclérotome, dermatome, derme, dérivés des arcs branchiaux, bourgeons de membres, sutures crâniennes, côtes, vertèbres (Li et al., 1995; Gong and Li, 2002; Scaal et al., 2001; Tamura and Noda, 1999; Lee et al., 2000; Bialek et al., 2004). Dans les structures osseuses, *TWIST2* est exprimé à la fois dans les chondroblastes et les ostéoblastes immatures (Bialek *et al.*, 2004).

Au cours de l'embryogénèse, *TWIST2* s'accumule à des taux élevés à la surface de l'embryon et dans les régions possédant des cellules chondrogéniques (périchondre) (Li *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2000). L'expression de *TWIST2* dans le derme et la peau persiste ainsi au niveau de la jonction épiderme-derme jusqu'à la naissance (Li *et al.*, 1995). En revanche, l'expression de *TWIST2* dans le derme n'est pas maintenue chez l'adulte (Li *et al.*, 1995).

b) Adulte

Chez l'adulte, les gènes *TWIST* sont exprimés à des niveaux basaux dans de nombreux tissus glandulaires, tubulaires ou épithéliaux dont les cellules gastriques principales, l'épithélium de la prostate, les hépatocytes, les tubes séminifères, la granulosa des follicules ovariens, les tubules rénaux collecteurs et sécrétoires, les glandes utérines, la corticosurrénale, les bronchioles ainsi que les alvéoles pulmonaires (Lee *et al.*, 2000).

Néanmoins, l'expression des gènes *TWIST* dans ces tissus est surtout cytoplasmique sauf dans les cellules moins différenciées. Cette localisation différente en fonction de l'état de différenciation cellulaire suggère que la fonction des gènes *TWIST* pourrait être différente dans les cellules différenciées. En effet, si les protéines Twist sont séquestrées dans le cytoplasme, elles ne peuvent plus jouer leur rôle de facteur de transcription nucléaire.

3. Fonctions et Invalidation

a) Invalidation partielle ou totale des gènes *TWIST*

Les délétions des gènes *TWIST1* ou *TWIST2* chez la souris sont toutes deux létales et mettent en évidence ainsi le rôle essentiel de ces deux gènes pour le développement et la survie (Chen and Behringer, 1995; Bourgeois et al., 1998). Néanmoins, ces mutants de délétion présentent des phénotypes différents.

La délétion du gène *TWIST1* chez la souris est létale pour l'embryon à J11.5. L'anomalie la plus remarquable est la non-fermeture du tube neural au niveau de la tête. Ces souris présentent également une apoptose massive dans les somites et d'autres anomalies au niveau du mésenchyme de la tête, des bourgeons de membres (Chen and Behringer, 1995). Chen et Behringer ont ainsi mis en évidence le rôle de *TWIST1* dans la régulation des cellules mésenchymales de la tête qui sont essentielles pour la formation du tube neural au niveau du crâne. Ils ont également

suggéré que *TWIST1* pourrait être essentiel pour la migration des cellules de la crête neurale (Chen and Behringer, 1995).

Les souris hétérozygotes pour la mutation nulle de *TWIST1* présentent un phénotype modéré, en comparaison des mutants homozygotes, avec des anomalies de formation du crâne et des membres (Chen and Behringer, 1995).

Les souris KO pour *TWIST2* présentent plusieurs anomalies notamment au niveau du développement des vertèbres, du métabolisme, du tissu adipeux, de la cicatrisation des plaies et de la régénération des poils (Gong and Li, 2002; Sosic et al., 2003). Alors qu'à la naissance ces souris paraissent normales, elles décèdent rapidement par cachexie avec 60 % de mort à 3 jours et 100 % à 15 jours (Sosic et al., 2003). Ces souris présentent une expression élevée de cytokines pro-inflammatoires $TNF\alpha$ et $IL-1\beta$ (Sosic et al., 2003). Sosic et ses collaborateurs ont montré que l'inactivation de *TWIST2* sensibilise les cellules à l'apoptose induite par le $TNF\alpha$ et que c'est pour cette raison que les souris invalidées pour *TWIST2* présentent une peau très fine avec beaucoup moins de poils que les souris sauvages (wild-type) (Sosic et al., 2003).

Par ailleurs, Sosic et ses collaborateurs ont montré que les souris doubles hétérozygotes pour les mutations nulles de *TWIST1* et *TWIST2* présentaient le même phénotype inflammatoire et mouraient également par cachexie post-natale (Sosic et al., 2003).

En revanche, l'expression de *TWIST2* chez les souris KO pour *TWIST1* ne permet pas de compenser l'absence de *TWIST1* (Chen and Behringer, 1995). Réciproquement, l'expression de *TWIST1* ne permet pas de compenser les effets de la délétion de *TWIST2* (Gong and Li, 2002).

Les phénotypes des mutants de délétions suggèrent que les gènes *TWIST1* et *TWIST2* seraient impliqués dans le développement de plusieurs tissus dont les os et la peau mais également dans des programmes cellulaires plus généraux tels que l'apoptose, la migration et la différenciation cellulaire. Ces mêmes mutants

indiquent que bien que les gènes *TWIST* soient homologues, certaines de leurs fonctions divergent.

b) Système immunitaire

Chez la drosophile, plusieurs groupes ont montré que le gène *TWIST* était induit après activation de la voie de signalisation de NF- κ B qui induit aussi des cytokines pro-inflammatoires et pro-apoptotiques dont TNF α et IL-1 β (Jiang et al., 1991). Par la suite, cette observation a été étendue aux gènes *TWIST1* et *TWIST2* chez la souris. Il a été montré que la protéine p65 (Rel-A) de la famille NF- κ B était nécessaire pour l'activation de l'expression des gènes *TWIST* ainsi que celle des cytokines TNF α et IL-1 β par la voie NF- κ B (Sosic *et al.*, 2003).

De plus, le groupe d'Olson a observé que les protéines Twist1 et Twist2 interagissaient via leur extrémité C-terminale avec la protéine p65 bloquant ainsi la transactivation de ces gènes cibles dont TNF α et IL-1 β (Sosic *et al.*, 2003). Ils ont également mis en évidence que les protéines Twist inhibaient l'expression des gènes TNF α et IL-1 β en se fixant sur les boîtes E des promoteurs. Ceci bloque, par encombrement stérique, l'accès aux sites I κ B voisins auxquels les facteurs de la famille NF- κ B dont p65 se lient pour activer l'expression de ces cytokines (Sosic *et al.*, 2003).

Les gènes *TWIST1* et *TWIST2* interviendraient donc dans une boucle de rétrocontrôle négatif de la voie NF- κ B. L'induction de cette voie activerait l'expression des gènes *TWIST* qui par la suite inhiberaient les fonctions des facteurs de la famille NF- κ B tel que p65. Ce rétrocontrôle négatif par les gènes *TWIST* viendrait ainsi réguler la boucle de rétrocontrôle positif induite par l'activation des cytokines TNF α et IL-1 β (Barnes and Karin, 1997).

Un autre rôle du gène *TWIST2* a été mis en évidence dans le système immunitaire. Il a été montré que *TWIST2* inhibait la différenciation et la prolifération des progéniteurs des granulocytes et macrophages (GMP) en

interagissant avec les cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , IL-12...) et en inhibant leur production (Sharabi et al., 2008).

En revanche, *TWIST2* induit la production de la cytokine régulatrice IL-10 par les cellules myéloïdes (Sharabi *et al.*, 2008). *TWIST2* jouerait donc un rôle essentiel dans la régulation des lignages myéloïdes ainsi que dans les réponses inflammatoires et la fonction des cellules myéloïdes matures.

c) Derme

Comme son nom l'indiquait, le gène *TWIST2*, ou Dermo1, est impliqué dans le développement du derme. Même s'il est exprimé dans d'autres tissus, il est considéré comme étant le seul marqueur dermique valable puisqu'il est exprimé dès les premières étapes de la différenciation dans les progéniteurs dermiques (Hornik, 2004; Dumont et al., 2008). Ceci est confirmé par les souris KO pour *TWIST2* qui présentent une peau très fine, translucide et qui a perdu ses propriétés mécaniques (Sobic *et al.*, 2003).

d) Ostéogénèse

L'étude de souris hétérozygotes pour la mutation inactivatrice de *TWIST1* a mis en évidence le rôle de *TWIST1* dans l'ostéogénèse. En effet, ces souris présentent une craniosynostose, c'est-à-dire la fermeture précoce des sutures crâniennes (el, V et al., 1997; Howard et al., 1997). De même, l'inhibition de l'expression des gènes *TWIST1* et *TWIST2* par ARN interférence augmente la différenciation et la maturation des cellules osseuses (Lee *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000). A l'inverse, la surexpression de *TWIST1* ou *TWIST2* bloque la différenciation ostéoblastique (Lee *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000).

Bialek et ses collaborateurs ont confirmé ces premières observations. Ils ont montré que les gènes *TWIST1* et *TWIST2* sont des inhibiteurs de la différenciation ostéoblastiques (Bialek *et al.*, 2004). Les protéines Twist seraient capables d'interagir via leur boîte Twist avec le domaine de liaison à l'ADN de la protéine Runx2 (ou CBFA1 ou OSF2) qui est un inducteur de la différenciation des

ostéoblastes (Ducy et al., 1997;Komori et al., 1997;Otto et al., 1997;Bialek *et al.*, 2004). Via cette interaction, Twist1 et Twist2 pourraient inhiber les fonctions de transactivation de Runx2 (Bialek *et al.*, 2004).

Par la suite, lorsque la différenciation des ostéoblastes est initiée, la protéine BMP2 inhiberait l'expression des gènes *TWIST* au profit de la *bone sialoprotein* (BSP) qui est un marqueur des ostéoblastes différenciés (Tamura and Noda, 1999;Bialek et al., 2004).

e) Myogenèse

Les protéines Twist1 et Twist2 sont des inhibiteurs de la myogenèse (Hebrok et al., 1994;Li et al., 1995;Gitelman, 1997;Hebrok et al., 1997;Gong and Li, 2002;Sosic et al., 2003). Cette inhibition passe par plusieurs mécanismes.

Il a été montré que les protéines Twist interagissaient via leur domaine HLH et C-ter avec le domaine basique de la protéine myogénique à domaine bHLH MyoD (Hebrok et al., 1997;Gong and Li, 2002). Bien que ce mécanisme ne semble pas principal, elles seraient également capables de séquestrer les protéines E qui sont nécessaires à MyoD pour son hétérodimérisation et ses fonctions (Spicer et al., 1996;Hamamori et al., 1997;Hebrok *et al.*, 1997). De plus, les protéines Twist pourraient inhiber l'activation du cofacteur myogénique MEF2 en bloquant son domaine de transactivation (Spicer et al., 1996;Hamamori et al., 1997;Gong and Li, 2002). Enfin, il a été montré que les protéines Twist pouvaient interagir via leur domaine N-terminal et inhiber l'activité Histone Acétyltransférase des complexes co-activateurs p300 et PCAF recrutés par les facteurs myogéniques dont MyoD et MEF2 (Hamamori et al., 1999;Gong and Li, 2002). En revanche, les protéines Twist1 et Twist2 n'affectent pas l'expression des protéines myogéniques MyoD (Gong and Li, 2002). Ces différents mécanismes permettent l'inhibition de l'activité de transactivation des facteurs myogéniques dont MyoD et MEF2.

Cette inhibition de la myogenèse est cohérente avec l'absence d'expression des protéines Twist dans le myotome dont les cellules sont destinées à la formation des muscles (Li *et al.*, 1995). Les protéines Twist1 et Twist2 ont un rôle d'assignation des précurseurs mésodermiques vers lignages du scléroderme et du

dermatome plutôt que lignage myoblastique dans les premiers stades du développement des somites (Lee *et al.*, 2000).

f) EMT

Chez la drosophile, lors de la gastrulation, le gène *TWIST* permet la migration des cellules du sillon ventral pour la formation du mésoderme (Leptin and Grunewald, 1990). Pour accomplir cette migration, les cellules se détachent les unes des autres et subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (epithelial-mesenchymal transition EMT) (Hay, 1995). L'EMT, processus conservé au cours de l'évolution, est également observée au cours du développement embryonnaire des vertébrés notamment pendant la gastrulation et la formation des crêtes neurales et de leurs dérivés (Hay, 1995; Thiery, 2002).

Par la suite, il a été montré que la surexpression de *TWIST1* dans des différents types de cellules épithéliales de rein (MDCK), mammaires (HMEC, MCF7) ou de la prostate provoquait une EMT (Yang *et al.*, 2004; Mironchik *et al.*, 2005; Kwok *et al.*, 2005). Celle-ci est caractérisée par la perte de l'adhésion cellule-cellule, l'inhibition de l'expression des marqueurs épithéliaux tels que l'E-cadhérine, les caténines (α , β , γ) et l'expression des marqueurs mésenchymaux que sont la fibronectine, la vimentine, la « *smooth muscle actine* » et la N-cadhérine (Thiery, 2002; Yang *et al.*, 2004). Les cellules ayant subies une EMT sont ensuite capable de migrer et d'envahir un tissu.

Au laboratoire, il a été montré que les deux protéines Twist1 et Twist2 étaient capables de coopérer avec H-Ras^{V12} ou ErbB2 pour provoquer une EMT complète lorsqu'elles sont surexprimées dans des cellules épithéliales mammaires HMEC [Figure 18] (Kang and Massague, 2004; Ansieau *et al.*, 2008).

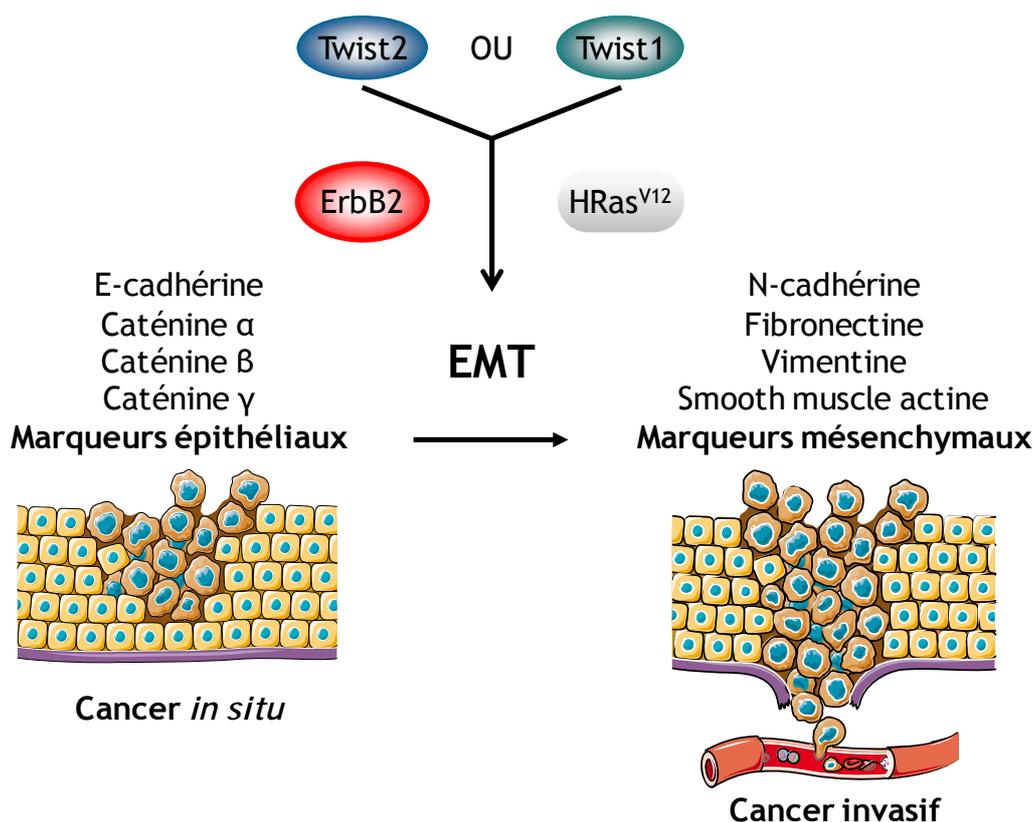


Figure 18 : Transition épithélio-mésenchymateuse
 Les protéines Twist peuvent induire une EMT complète en coopérant avec HRas^{V12} ou ErbB2. Figure adaptée de Kang and Massague, 2004.

g) Apoptose

Plusieurs travaux ont montré que les protéines Twist1 et Twist2 sont des facteurs de survie cellulaire (Chen and Behringer, 1995;Maestro et al., 1999;Valsesia-Wittmann et al., 2004). En effet, chez la souris, l'absence de *TWIST2* est corrélée avec une apoptose massive des cellules des somites (Chen and Behringer, 1995). Par la suite, dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEF), Maestro et ses collaborateurs ont montré que la surexpression des gènes *TWIST1* ou *TWIST2* bloquait l'apoptose induite par l'oncogène *c-MYC* en inhibant les fonctions de transactivation de la protéine p53 et en réduisant la transcription du gène *ARF* (Maestro et al., 1999).

Au laboratoire, il a été montré que l'expression de *TWIST1* dans les neuroblastomes *N-MYC* Amplifiés permet d'inhiber l'apoptose induite par l'oncogène *N-MYC* (Valsesia-Wittmann et al., 2004). En effet, l'inhibition de l'expression de *TWIST1* dans des lignées de neuroblastome déclenche une apoptose

massive des cellules. A l'inverse l'expression ectopique de *TWIST1* dans des cellules de neuroblastome Simple Copie inhibe la voie p53 et par conséquent la réponse à un stress génotoxique ou oncogénique. Il a été proposé que le blocage de l'apoptose par les protéines Twist passe par l'inhibition de l'expression du gène *ARF* mais aussi par des mécanismes indépendants de ce dernier (Valsesia-Wittmann *et al.*, 2004).

Le groupe de Raman a montré que la surexpression de *TWIST1* compromettait la phosphorylation de la serine 20 de p53 qui est essentielle pour les fonctions apoptotiques de p53 (Stasinopoulos *et al.*, 2005). Il a également mis en évidence que *TWIST1* était capable d'interagir avec le facteur de transcription *HOXA5* et d'inhiber ainsi la fonction de cet activateur de l'expression de p53 (Stasinopoulos *et al.*, 2005). Les protéines Twist sont ainsi capables d'inhiber la voie ARF/MDM2/p53 selon différents mécanismes et à différents niveaux.

h) microARN

Comme pour les gènes *MYC*, des études rapportent l'existence de miARN impliqués dans la régulation et les fonctions des gènes *TWIST*. Dans le modèle de la drosophile, il a été tout d'abord montré que le gène *dTWIST* pouvait induire l'expression de miR-1 au cours du développement de la larve dans le mésoderme (Biemar *et al.*, 2005; Sokol and Ambros, 2005).

Par la suite, dans des cellules de cancer du sein, il a été montré que *TWIST1* induisait l'expression de miR-10b lui-même responsable des propriétés de migration et d'invasion de ces cellules tumorales (Ma *et al.*, 2007).

Enfin, plus récemment, il a été montré que *TWIST1* induisait l'expression du cluster portant miR-199a et miR-214 (Lee *et al.*, 2009). Suite à l'expression de *TWIST1*, ces deux miARN sont exprimés, au stade E12,5 du développement embryonnaire de la souris, aux mêmes sites que *TWIST1* : le cervelet, le cerveau, les processus nasaux et les bourgeons des membres (Lee *et al.*, 2009). Les auteurs ont ainsi suggéré que ces deux miARN interviendraient dans le développement neural induit par les gènes *TWIST*. Au vu des fonctions de *TWIST1*, miR-199a et

miR-214 pourraient réguler la différenciation ou les capacités de migration de cellules progénitrices.

Le rapprochement des données obtenues pour miR-10b, miR-199a et miR-214 suggère que ces miARN joueraient un rôle clé dans les fonctions physiologiques de *TWIST1* mais également oncogénique. En effet, nous avons vu qu'un miARN peut inhiber l'expression de nombreuses cibles. Par conséquent, l'intervention des miARN dans une voie de signalisation cellulaire telle que celle des gènes *TWIST* permet d'amplifier la réponse cellulaire. Ceci pourrait expliquer en partie les propriétés tumorales acquises par les cellules présentant une dérégulation de l'expression de *TWIST1*.

L'identification de miARN capables capable d'intervenir dans les fonctions physiologiques et oncogéniques des gènes *TWIST* suggère que l'établissement de profils miARN de cellules tumorales et/ou normales pourrait constituer une voie particulièrement intéressante pour l'étude des fonctions des gènes *TWIST* et de la tumorigénèse induite par ces oncogènes.

i) Cellules souches

Dans les cellules souches mésenchymales (MSC), Isenmann et ses collaborateurs ont montré que la surexpression des gènes *TWIST1* et *TWIST2* est accompagnée d'une augmentation de la transcription des facteurs de la superfamille HLH : *Id-1* et *Id-2* (Isenmann et al., 2009; Benezra et al., 1990). Ces protéines Id ont été décrites comme étant des régulateurs positifs du cycle cellulaire et des inhibiteurs de la différenciation cellulaire (Norton and Atherton, 1998).

Or, la surexpression de *TWIST1* ou *TWIST2* dans les MSC induit le maintien du phénotype immature et l'augmentation de l'espérance de vie des MSC humaines en inhibant l'ostéogénèse et la chondrogenèse tandis qu'il augmente l'adipogenèse (Isenmann *et al.*, 2009). Il semble ainsi que les protéines Twist interviennent dans la croissance et l'auto-renouvellement des MSC via la régulation des gènes *Id-1* et *Id-2* (Isenmann *et al.*, 2009).

4. Syndromes et cancers

Nous avons vu que les gènes *TWIST* sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires parmi lesquelles l'apoptose et l'EMT. La régulation de l'expression des gènes *TWIST* est donc un mécanisme important dont les anomalies peuvent avoir des conséquences dramatiques.

Parce que ce sont des gènes du développement, la dérégulation de l'expression des gènes *TWIST* a d'abord été identifiée dans des syndromes par haploinsuffisance. Par la suite, la surexpression de *TWIST1* puis de *TWIST2* a été mise en évidence dans les cancers.

a) Syndromes

Chez l'homme, l'hétérozygotie du gène *TWIST1* est retrouvée dans le syndrome de Saethre-Chotzen marqué par une craniosynostose (fusion prématurée des sutures du crâne) et souvent associé à un dysmorphisme facial et à des anomalies au niveau des pieds et des mains (el, V *et al.*, 1997;Howard *et al.*, 1997;Gripp *et al.*, 2000).

Des mutations non-sens du gène *TWIST2* ont été observées chez des patients atteints du syndrome de Setleis qui se caractérise par une dysplasie ectodermique principalement faciale et ophtalmique (Prescott *et al.*, 2006).

Comme nous l'avons vu précédemment, ces syndromes confirment le rôle d'inhibiteurs de la différenciation des gènes *TWIST1* et *TWIST2* puisque la perte de l'expression de *TWIST1* conduit à une différenciation prématurée des ostéoblastes et la perte de *TWIST2* conduit à des malformations au niveau de la peau.

b) Cancer

Le rôle oncogénique de *TWIST1* et *TWIST2* a été pour la première fois rapporté par le groupe de Maestro dans le rhabdomyosarcome (Maestro *et al.*, 1999). Ces oncogènes, à l'époque nommés respectivement *H-TWIST* et *DERMO1*,

II. GENERALITES - Les gènes *TWIST*

ont été découverts lors d'un crible d'une banque d'ADNc dont l'objectif était d'identifier des gènes capables d'inhiber l'apoptose induite par *MYC* (Maestro *et al.*, 1999). Lors de l'identification du potentiel oncogénique de *TWIST1* et *TWIST2*, il a également été montré que ces deux gènes pouvaient empêcher l'arrêt du cycle cellulaire induit par la voie de signalisation p53/p21 (Maestro *et al.*, 1999).

Cancer	Dérégulation	Rôle
Cerveau	Surexpression dans les papillomes du plexus choroïde (Hasselblatt <i>et al.</i> , 2009)	Prolifération & invasion (Hasselblatt <i>et al.</i> , 2009)
Col de l'utérus	Surexpression dans 45,5 % des tumeurs (Shibata <i>et al.</i> , 2008)	Facteur de mauvais pronostic (Shibata <i>et al.</i> , 2008)
Endomètre	Surexpression dans 51 % des tumeurs (Kyo <i>et al.</i> , 2006)	EMT & Métastases, cible thérapeutique (Kyo <i>et al.</i> , 2006)
Estomac	Surexpression (Rosivatz <i>et al.</i> , 2002;Feng <i>et al.</i> , 2009;Stasinopoulos <i>et al.</i> , 2005)	EMT & métastases (Rosivatz <i>et al.</i> , 2002;Yang <i>et al.</i> , 2007;Luo <i>et al.</i> , 2008;Feng <i>et al.</i> , 2009) Facteur de mauvais pronostic & cible thérapeutique (Yan-Qi <i>et al.</i> , 2007;Feng <i>et al.</i> , 2009)
Foie	Surexpression dans les carcinomes hépatocellulaires (Lee <i>et al.</i> , 2006) Surexpression dans 80 % des cancers primitifs du foie (Xu and Chen, 2007)	Angiogenèse & métastases (Niu <i>et al.</i> , 2007) EMT & métastases (Lee <i>et al.</i> , 2006;Matsuo <i>et al.</i> , 2009)
Thyroïde	Surexpression dans 88 % des adénomes et 75 % des hyperplasies des glandes parathyroïdiennes (Fendrich <i>et al.</i> , 2009)	EMT & métastases (Fendrich <i>et al.</i> , 2009)
Gliome	Surexpression dans 11/12 tumeurs, corrélée avec tumeurs agressives (Elias <i>et al.</i> , 2005)	Agressivité tumorale (Elias <i>et al.</i> , 2005)
Surrénale	Surexpression dans 66 % des phéochromocytomes (Waldmann <i>et al.</i> , 2009)	
Nasopharynx	Surexpression dans 62 % des tumeurs (Song <i>et al.</i> , 2006)	Résistance à la vincristine & au taxol (Wang <i>et al.</i> , 2004;Zhang <i>et al.</i> , 2007a) EMT & métastases (Horikawa <i>et al.</i> , 2007)
Néphroblastome	Surexpression due à une insertion virale de <i>MAV2</i> en <i>amont</i> de <i>TWIST1</i> (Pajer <i>et al.</i> , 2003)	
Neuroblastome	Surexpression dans les neuroblastomes <i>N-MYC</i> Amplifiés (Valsesia-Wittmann <i>et al.</i> , 2004)	Coopération oncogénique <i>N-MYC/TWIST1</i> (Valsesia-Wittmann <i>et al.</i> , 2004)
Œsophage	Surexpression dans 67 % des carcinomes épidermoïdes œsophagiens (Yuen <i>et al.</i> , 2007a;Xie <i>et al.</i> , 2009)	Métastases et mauvais pronostic (Yuen <i>et al.</i> , 2007a;Xie <i>et al.</i> , 2009)
Ostéosarcome	Réarrangements du locus <i>TWIST1</i> (Entz-Werle <i>et al.</i> , 2005)	Mauvais pronostic (Entz-Werle <i>et al.</i> , 2007)
Ovaire	Surexpression dans 48,1 % des carcinomes à cellules claires de l'ovaire (Kajiyama <i>et al.</i> , 2006) Surexpression dans 40,2 % des carcinomes épithéliaux ovariens (CEO ou EOC) (Hosono <i>et al.</i> , 2007)	Mauvais pronostic (Kajiyama <i>et al.</i> , 2006;Hosono <i>et al.</i> , 2007) Résistance au cisplatine et à la vincristine (Li <i>et al.</i> , 2007;Wang <i>et al.</i> , 2004) Cible thérapeutique (Terauchi <i>et al.</i> , 2007)
Pancréas	Surexpression (Ohuchida <i>et al.</i> , 2007)	EMT et métastases (Hotz <i>et al.</i> , 2007)

Cancer	Dérégulation	Rôle
Poumon		Résistance au cisplatine et Cible thérapeutique (Zhuo et al., 2008)
Prostate	Surexpression dans 90 % des cas (Kwok et al., 2005)	Résistance à la vincristine et au taxol (Wang et al., 2004; Kwok et al., 2005) EMT et métastases (Kwok et al., 2005; Yuen et al., 2007b; Yuen et al., 2008) Inhibition de la sénescence oncogénique (Kwok et al., 2007) cible thérapeutique (Wallerand et al., 2009)
Sein	Surexpression dans >52 % des tumeurs (Watanabe et al., 2004)	Angiogenèse (Mironchik et al., 2005) EMT et métastases (Yang et al., 2004; Martin et al., 2005) Résistance au taxol (Cheng et al., 2007)
Tête & cou	Surexpression dans 67 % des carcinomes de cellules d'axe (Kojc et al., 2009)	Métastases et progression tumorale (Ou et al., 2008; Yang et al., 2008) EMT et métastases (Kojc et al., 2009)
Vessie	Surexpression dans plus de 60 % des tumeurs (Zhang et al., 2007b)	Résistance à la vincristine (Wang et al., 2004) Facteur de mauvais pronostic (Zhang et al., 2007b) Cible thérapeutique (Wallerand et al., 2009)

Tableau 6 : Dérégulation et rôles de l'oncogène *TWIST1* dans les cancers

Depuis 1999, de nombreux travaux ont mis en évidence la dérégulation de *TWIST1* dans de nombreux cancers allant des carcinomes aux sarcomes, en passant par des cancers des cellules embryonnaires, germinales, neuronales, aussi bien hormonodépendant que non, et affectant de nombreux organes [Tableau 6].

Au sein du laboratoire, l'analyse de profils d'expression génique a mis en évidence la dérégulation de *TWIST1* dans des neuroblastomes *N-MYC* amplifiés. Et il a été montré que *TWIST1* coopérait avec *N-MYC* en inhibant l'apoptose induite par ce dernier (Valesia-Wittmann et al., 2004).

Les propriétés anti-apoptotiques des gènes *TWIST* ont notamment été évoquées comme mécanisme de chimiorésistance à plusieurs drogues cytotoxiques : (i) le cisplatine pour le cancer de l'ovaire et du poumon ; (ii) la vincristine pour les cancers du nasopharynx, de la vessie, de l'ovaire et de la prostate ; et (iii) le taxol pour les cancers du nasopharynx, du sein et de la prostate (Li et al., 2007; Wang et al., 2004; Kwok et al., 2005; Zhang et al., 2007a; Cheng et al., 2007; Zhuo et al., 2008).

En 2007, il a été montré que *TWIST1* pouvait inhiber la sénescence prématurée (ou Oncogene Induced Senescence) en bloquant les fonctions du gène

ARF ce qui inhibe la voie de signalisation MDM2/p53 et la voie de réponse aux dommages à l'ADN Chk1/2 (Kwok *et al.*, 2007). Au sein de notre laboratoire, il a été montré que l'expression des gènes *TWIST1* et *TWIST2* permettait l'inhibition de la sénescence prématurée induite par *RAS* en inhibant les voies de signalisation des protéines p53 et pRB (Ansieau *et al.*, 2008).

En parallèle de l'inhibition de l'apoptose et de la sénescence, *TWIST1* est également capable d'induire l'EMT des cellules tumorales d'origine épithéliale. Il a ainsi été montré au laboratoire que les gènes *TWIST1* et *TWIST2*, en coopération avec les oncogènes *RAS* ou *ERBB2*, pouvaient induire une EMT (Ansieau *et al.*, 2008). Cette EMT induite par le gène *TWIST1* a été mise en évidence et corrélée à la survenue de métastases dans de nombreuses tumeurs telles que le cancer de la prostate, de l'endomètre ou de l'estomac [Tableau 6].

Par conséquent, il apparaît que l'inhibition des systèmes de sauvegarde cellulaire et l'induction de l'EMT confèrent un avantage sélectif aux cellules tumorales et favorisent la formation de métastases comme cela a été montré dans les cancers du sein, de la prostate et du foie (Yang *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005; Yuen *et al.*, 2007b; Lee *et al.*, 2006; Matsuo *et al.*, 2009).

Par ailleurs, il a été montré dans des mélanomes, des cancers du sein et du foie que *TWIST1* induisait la néoangiogenèse grâce à l'expression de facteurs angiogéniques dont le *VEGF* (Hu *et al.*, 2008; Mironchik *et al.*, 2005; Niu *et al.*, 2007).

De manière plus générale, la surexpression de *TWIST1* a été corrélée à l'occurrence de métastases et identifiée comme marqueur de mauvais pronostic dans de nombreux cancers [Tableau 6] (Elias *et al.*, 2005; Entz-Werle *et al.*, 2007; Yuen *et al.*, 2007a; Xie *et al.*, 2009; Niu *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2008; Yuen *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2007; Yan-Qi *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2009; Kajiyama *et al.*, 2006; Hosono *et al.*, 2007; Kyo *et al.*, 2006; Shibata *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2007b; Ou *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008).

Bien que fonctionnellement homologue avec le gène *TWIST1*, peu d'études se sont intéressées au gène *TWIST2* dans le cancer. En comparant deux sous-types de Leucémies Lymphoïdes Chroniques, le groupe de Plass a suggéré que, dans les LLC non mutées pour les Ig V_H, l'expression de *TWIST2* était le principal mécanisme d'inactivation fonctionnelle de la voie de signalisation p53 (Raval et al., 2005). Il a montré ainsi que *TWIST2* était un facteur de survie dans les LLC non mutées pour les Ig V_H. Au laboratoire, nous avons montré que *TWIST2* était surexprimé dans le mélanome et les cancers du colon, du rein, de l'œsophage, du poumon, du sein et du foie (Ansieau *et al.*, 2008).

Nous remarquons ainsi que les gènes *TWIST*, *TWIST1* en particulier (parce qu'il a été plus étudié dans ce contexte), peuvent intervenir dans les étapes cruciales du développement tumoral :

- inhibition de l'apoptose : chimiorésistance, survie de la tumeur primaire et des cellules tumorales métastatiques dans la circulation sanguine et dans le(s) tissu(s) envahi(s)
- inhibition de la sénescence : continuation du cycle cellulaire et prolifération
- inhibition de la différenciation : maintien du potentiel prolifératif
- angiogénèse : (i) apport des nutriments et de l'oxygène essentiels pour la croissance de la tumeur primaire, (ii) ainsi qu'accès facilité pour l'infiltration de cellules tumorales dans la circulation sanguine
- EMT et migration des cellules tumorales : formation de métastases, invasion des tissus sains environnants mais également à distance.

Enfin, l'implication des gènes *TWIST1* et *TWIST2* dans les différentes étapes du processus tumoral et leur pouvoir pronostic dans certains cancers laisse supposer qu'ils pourraient être des cibles thérapeutiques en complément des traitements actuels [Tableau 6] (Kyo et al., 2006; Terauchi et al., 2007; Yan-Qi et al., 2007; Feng et al., 2009; Zhuo et al., 2008; Wallerand et al., 2009).

II. GENERALITES - Les gènes *TWIST*

Par conséquent, l'étude de la régulation et des fonctions des gènes *TWIST1* et *TWIST2* au cours du processus tumoral et en particulier dans le modèle du neuroblastome nous apparaissent comme des éléments pertinents pour mieux définir le rôle des gènes *TWIST* dans ce contexte et déterminer s'ils peuvent être utilisés comme facteurs pronostics et/ou comme cibles thérapeutiques.

**BASES RATIONNELLES
&
OBJECTIFS**

III. BASES RATIONNELLES

Le neuroblastome dérive des neuroblastes destinés à la formation des glandes surrénales et au système nerveux sympathique. La transformation tumorale de ces cellules peut se produire selon différents mécanismes. De plus, les neuroblastes malins ont un phénotype rappelant celui des neuroblastes lors du développement du système nerveux périphérique (morphologie, capacité de différenciation). La grande hétérogénéité biologique et clinique des tumeurs neuroblastiques suggère la survenue d'un événement oncogénique lors d'une étape de différenciation du neuroblaste normal. Aussi, le neuroblastome nous apparaît comme un modèle particulièrement pertinent pour étudier la relation anomalies du développement embryonnaire et cancer.

La dérégulation et l'amplification de *N-MYC* sont des événements majeurs de la tumorigenèse du neuroblastome. Au sein du laboratoire, la coopération oncogénique entre *N-MYC* et *TWIST1* a été mise en évidence dans le neuroblastome (Valesia-Wittmann *et al.*, 2004). Dans ce contexte, l'activation oncogénique de *N-MYC* induit la prolifération des neuroblastes et l'apoptose. Quant à *TWIST1*, il agit comme facteur de survie en inhibant la mort cellulaire induite par *N-MYC*. Ces observations et les propriétés des familles *MYC* et *TWIST* précédemment rapportées mettent en évidence la complémentarité de ces gènes dans le processus tumoral. Elles suggèrent ainsi que la dérégulation et la coopération entre les oncogènes *MYC* et *TWIST* pourrait s'étendre à d'autres cancers.

Par ailleurs, le gène *c-MYC* et son homologue fonctionnel *N-MYC* sont des oncogènes impliqués dans de nombreux cancers. De même, les gènes *TWIST1* et *TWIST2* exercent des fonctions communes induisant la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales et régulant de manière négative les systèmes de sauvegarde cellulaire (apoptose et sénescence) et la différenciation.

Enfin, nous avons vu d'une part que le gène *c-MYC* associé aux gènes *OCT3/4*, *SOX2* et *KLF4* pouvait reprogrammer une cellule différenciée en cellule souche pluripotente et d'autre part que les gènes *TWIST* sont normalement

exprimés dans des cellules souches ou progénitrices. Par conséquent, la surexpression des gènes *MYC* (*c-MYC* et *N-MYC*) et/ou *TWIST* (*TWIST1* et *TWIST2*) pourrait participer à la dédifférenciation de cellules différenciées normales et induire leur transformation tumorale.

Ainsi, l'ensemble de ces données nous ont conduit à nous interroger sur le rôle des gènes du développement *MYC* et *TWIST* dans le cadre du processus tumoral, et en particulier dans le neuroblastome.

IV. OBJECTIFS

Partant de la question : **Quels sont les rôles des gènes du développement *MYC* et *TWIST* dans le processus tumoral ?**

Nous avons choisi de travailler dans le modèle du neuroblastome. En effet, comme nous l'avons vu, ce cancer est un modèle particulièrement pertinent, notamment parce qu'il avait été montré, au laboratoire, que la surexpression des gènes *N-MYC* et *TWIST1* était corrélée dans les neuroblastomes de stade 4 *N-MYC* amplifiés (Valesia-Wittmann *et al.*, 2004).

Pour répondre à cette question, nos travaux ont été basés sur deux axes :

- (i) l'étude de la synergie d'expression et le lien transcriptionnel entre les oncogènes *MYC* et *TWIST* : partie « **Coopération oncogénique entre *MYC* et *TWIST*** »
- (ii) l'étude de leur rôle respectif dans les étapes initiales de la tumorigenèse en tentant d'établir un modèle de progression tumorale à partir de cellules souches adultes dérivées du tissu adipeux (ADAS) : partie « **Modèle de progression tumorale** »

Coopération oncogénique entre *MYC* et *TWIST*

La corrélation d'expression observée entre *MYC* et *TWIST* dans le neuroblastome suggère une inter-régulation transcriptionnelle entre ces facteurs de transcription. Les oncoprotéines Myc étant connues pour réguler de nombreux gènes, il s'agissait de confirmer ou d'infirmer ce lien transcriptionnel.

Nous avons donc analysé :

- La dérégulation des gènes *MYC* et *TWIST* dans le neuroblastome
- La dérégulation des gènes *MYC* et *TWIST* dans les cancers du colon et du sein
- Les conséquences de la modulation de l'expression de *N-MYC* ou *c-MYC* sur l'expression des gènes *TWIST*.

Puis par la suite, nous avons mis en évidence :

- La fixation des protéines c-Myc et N-Myc sur les boîtes E du promoteur du gène *TWIST1*
- L'activation du promoteur de *TWIST1* par les protéines Myc.

Ces travaux font l'objet d'une publication en préparation présentée en **Annexe**.

Modèle de progression tumorale

Afin d'étudier le rôle des gènes *MYC* et *TWIST* dans les étapes précoces de la tumorigenèse du neuroblastome, nous avons pour objectif de développer un modèle de progression tumorale. Ne disposant pas de neuroblastes humains, ni de cellules souches à l'origine des neuroblastes, nous avons évalué, en collaboration avec le Dr Maguer-Satta, la possibilité d'utiliser des cellules souches adultes dérivées de tissu adipeux (ADAS) pour développer un modèle de progression tumorale. Ces cellules ADAS sont capables de se différencier en différents types cellulaires et notamment les lignages neuraux.

Pour cette partie, nous avons d'abord :

- Mis au point les conditions d'extraction des cellules ADAS
- Caractérisé le phénotype des cellules ADAS.

Puis nous avons analysé :

- Les capacités de différenciation des cellules ADAS
- Les possibilités de transfection
- La chimiosensibilité aux drogues.

Les conditions de culture à partir de prélèvements adipeux et de transfection ont été mises au point. Il s'agit désormais de moduler l'expression des gènes d'intérêt dans ce système.

RESULTATS

V. RESULTATS

A. Coopération oncogénique entre MYC et TWIST

1. Dérégulation de l'expression des gènes MYC et TWIST dans le neuroblastome

a) Lignées de neuroblastome

Des travaux réalisés précédemment au laboratoire suggéraient une corrélation d'expression entre les gènes *TWIST1* et *N-MYC* dans les neuroblastomes *N-MYC* amplifiés (Valesia-Wittmann *et al.*, 2004). Le premier but de nos travaux était de valider et d'étendre cette observation aux autres membres des familles *MYC* et *TWIST*. En effet, comme nous venons de le voir, les gènes *c-MYC* et *TWIST2* partagent une homologie structurale et fonctionnelle avec respectivement *N-MYC* et *TWIST1* qui sont impliqués dans le neuroblastome.

Dans une première étape, nous avons évalué par RT-PCR quantitative l'expression des quatre gènes *N-MYC*, *c-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* dans 25 lignées de neuroblastome : 7 Simple Copie (SC) et 18 *N-MYC* Amplifiées (NMA) [Figure 19; Tableau 7]. L'expression de ces gènes est rapportée aux gènes de référence *CPB1* et *HPRT1* préalablement validés au cours d'une étude sur 12 gènes de ménage (voir Matériel & Méthodes).

Les résultats présentés montrent une surexpression de *N-MYC* dans toutes (18/18) les lignées *N-MYC* Amplifiées et de *TWIST1* dans 16 sur 18 de ces lignées NMA [Figure 19A]. Pour les 2 lignées NMA (CLB-Ca, IMR32) surexprimant *N-MYC* mais pas *TWIST1*, il est vraisemblable que d'autres altérations ont été sélectionnées. Dans les lignées NMA, *TWIST2* est faiblement exprimé dans 3 lignées (IMR32, CLB-Bar et LS) [Figure 19B]. Enfin, *c-MYC* n'est pas exprimé dans les lignées NMA. Ces données confirment la corrélation d'expression entre *N-MYC* et *TWIST1* dans les lignées *N-MYC* amplifiées. *TWIST2* et *c-MYC* ne semblent pas être dérégulés dans les lignées de neuroblastome *N-MYC* amplifiées.

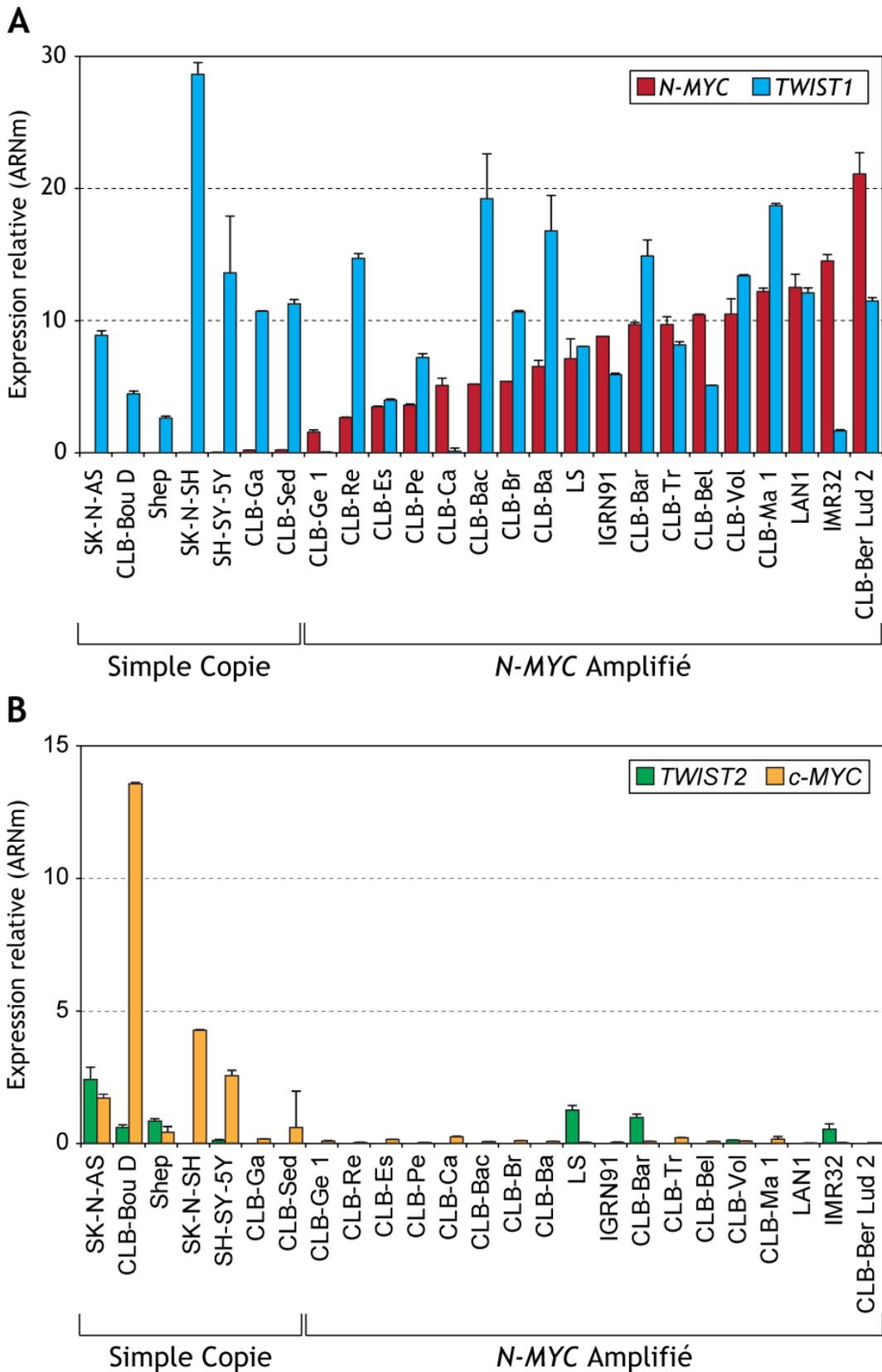


Figure 19 : Expression des gènes MYC & TWIST (RT-PCR quantitative) dans les lignées de neuroblastome

L'expression des gènes MYC et TWIST a été analysées dans 25 lignées : 7 Simple Copie et 18 N-MYC Amplifiées. Il existe une corrélation entre l'expression des gènes N-MYC et TWIST1 dans les lignées NMA.

Statut <i>N-MYC</i>	Lignée	Expression relative			
		<i>N-MYC</i>	<i>TWIST1</i>	<i>c-MYC</i>	<i>TWIST2</i>
<i>N-MYC</i> Amplifié	CLB-Ba	6,53	16,80	0,07	---
NMA	CLB-Bac	5,20	19,24	0,06	---
NMA	CLB-Bar	9,70	14,90	0,06	0,98
NMA	CLB-Bel	10,43	5,10	0,06	---
NMA	CLB-Ber Lud 2	21,10	11,49	0,02	---
Simple Copie	CLB-Bou D	0,00	4,47	13,56	0,59
NMA	CLB-Br	5,42	10,66	0,10	---
NMA	CLB-Ca	5,09	0,14	0,24	---
NMA	CLB-Es	3,49	3,99	0,14	---
SC	CLB-Ga	0,19	10,72	0,16	---
NMA	CLB-Ge 1	1,57	0,05	0,08	---
NMA	CLB-Ma 1	12,22	18,71	0,15	---
NMA	CLB-Pe	3,61	7,21	0,03	---
NMA	CLB-Re	2,67	14,72	0,03	---
SC	CLB-Sed	0,21	11,28	0,60	---
NMA	CLB-Tr	9,71	8,17	0,21	---
NMA	CLB-Vol	10,50	13,41	0,08	0,12
NMA	IGRN91	8,82	5,92	0,03	---
NMA	IMR32	14,53	1,64	0,02	0,53
NMA	LAN1	12,52	12,11	0,01	---
NMA	LS	7,11	8,05	0,03	1,25
SC	SHEP	0,01	2,63	0,42	0,84
SC	SH-SY-5Y	0,04	13,63	2,55	0,11
SC	SK-N-AS	---	8,90	1,70	2,40
SC	SK-N-SH	0,02	28,65	4,27	---
SC	TET21N	0,01	3,04	0,44	0,93
SC	WAC	14,11	2,02	0,03	1,84

Tableau 7 : Dérégulation de l'expression des gènes *MYC* & *TWIST* dans les lignées de neuroblastome

Expression analysée par RT-PCR quantitative. Les lignées sont classées par ordre alphabétique

Dans les lignées Simple Copie, bien que *N-MYC* ne soit pas exprimé (0/7), nous constatons que *TWIST1* est exprimé dans toutes les lignées (7/7) [Figure 19A]. Nous constatons également une surexpression de *c-MYC* dans 4 lignées SC (SK-N-AS,

CLB-BouD, SK-N-SH et SH-SY-5Y) [Figure 19B]. *TWIST2* est exprimé dans 3 lignées SC (SK-N-AS, CLB-BouD et SHEP). Il est à noter que dans le cas des lignées CLB-Ga et CLB-Sed, des études préalables au laboratoire (données personnelles du Dr Valsesia-Wittmann) ont montré une surexpression de huD responsable de la stabilisation des ARNm *N-MYC* et donc d'une augmentation du taux de traduction de ces ARNm. Par conséquent, ces lignées présentent une surexpression protéique de N-Myc sans augmentation du nombre de transcrits.

Ces résultats indiquent que dans les lignées de neuroblastome Simple Copie, la surexpression de *TWIST1* pourrait être corrélée à la dérégulation de l'expression de *N-MYC* (CLB-Ga et CLB-Sed) ou de *c-MYC* (SK-N-AS, CLB-BouD, SK-N-SH et SH-SY-5Y). En revanche, la dérégulation de l'expression de *TWIST2* n'interviendrait pas non plus dans les lignées Simple Copie.

L'analyse des lignées de neuroblastome montre que (i) dans les lignées *N-MYC* Amplifiées, la dérégulation de *TWIST1* est corrélée à celle de *N-MYC* et (ii) dans les lignées Simple Copie la surexpression de *TWIST1* est associée à celle de *c-MYC* ou à une dérégulation de *N-MYC* au niveau traductionnel.

b) Tumeurs de neuroblastome

Afin d'étudier la dérégulation des gènes *MYC* et *TWIST* dans les tumeurs de neuroblastome, nous avons analysé leur expression par RT-PCR quantitative dans 20 échantillons tumoraux du Texas Children Hospital (USA) fournis par le Dr Hogarty : 15 Simple Copie et 5 *N-MYC* amplifiés [Figure 20 ; Tableau 8]. L'expression des gènes *c-MYC*, *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* est rapportée à celle des gènes de référence *CFL1* et *GAPDH*.

Pour les tumeurs Simple Copie, *N-MYC* et *TWIST2* ne sont exprimés dans aucun échantillon (0/15). En revanche, *TWIST1* est exprimé dans 6 tumeurs SC (1652, 1236, 1569, 1120, 980 et 1000) et *c-MYC* dans 7 sur 15 échantillons (1963, 1652, 1236, 1120, 2008, 1754 et 1998).

Dans les tumeurs *N-MYC* amplifiées, *N-MYC* est exprimé dans 4 sur 5 échantillons (1964, 1688, 1570 et 1840) [Figure 20A]. *TWIST1* de même que *c-MYC*

sont exprimés dans 4 tumeurs NMA (1830, 1688, 1570 et 1840). Enfin, *TWIST2* est exprimé dans un seul cas (1830) [Figure 20B].

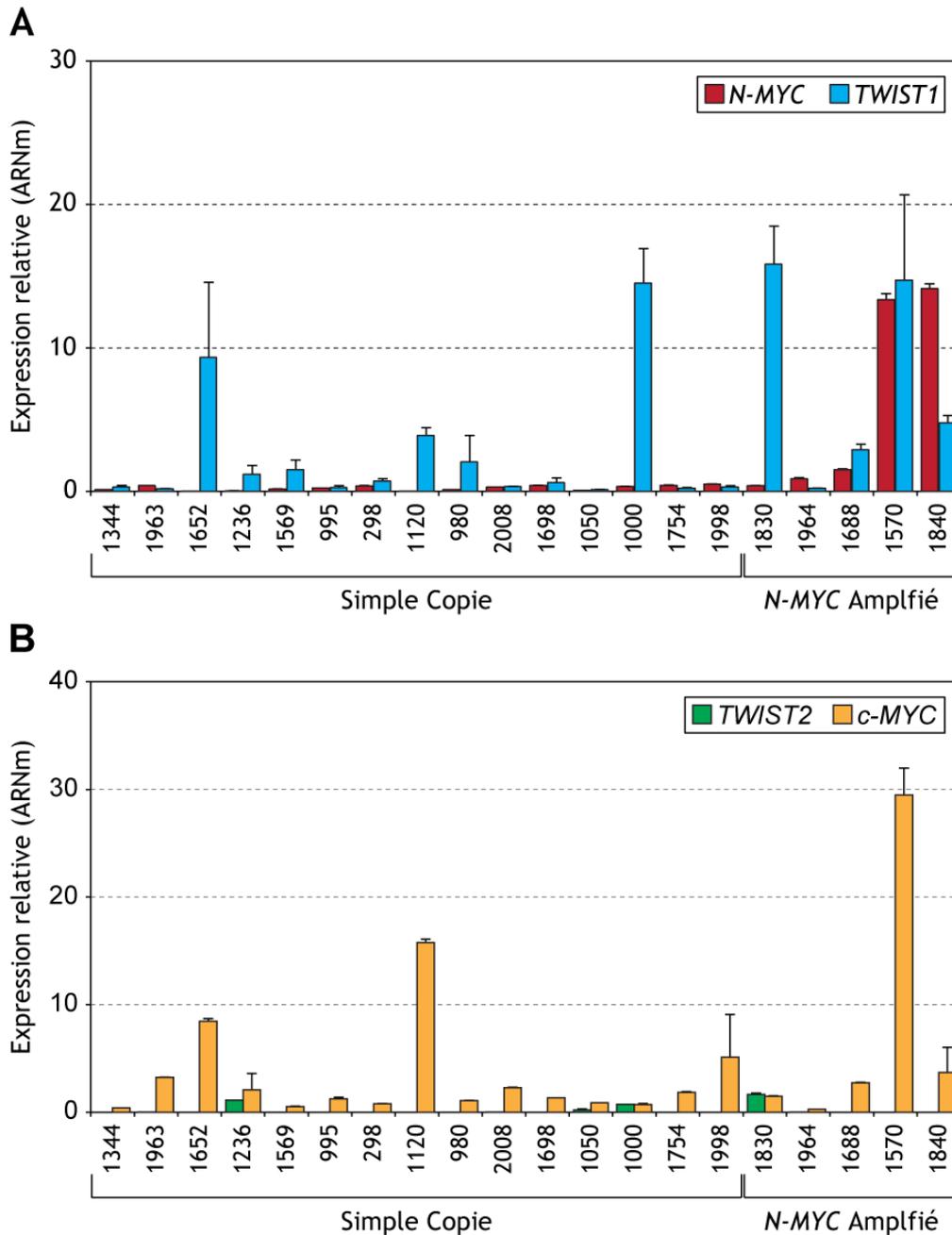


Figure 20 : Expression des gènes *MYC* & *TWIST* (RT-PCR quantitative) dans des tumeurs de neuroblastome

Analyse effectuée sur 20 échantillons provenant du Texas Children Hospital, USA.

Ainsi, nous constatons d'abord que *TWIST2* n'est pas dérégulé dans ces échantillons et ne semble pas contribuer au neuroblastome quel que soit le stade et le statut *MYC*. En revanche, *TWIST1* est dérégulé en association avec *N-MYC* dans les tumeurs *N-MYC* Amplifiées et *c-MYC* dans certaines tumeurs Simple Copie de mauvais pronostic [Tableau 8]. En effet, en cherchant à corrélérer la dérégulation

de *TWIST1* avec le stade initialement établi selon la classification histologique de Shimada, il apparaît que les tumeurs SC présentant une surexpression de *TWIST1* ont des caractéristiques différentes. La tumeur 1120 est de stade 2B mais de pronostic défavorable tandis que la 1652 est de stade 2B favorable mais ayant eu un devenir défavorable. De plus, la tumeur 1000, qui présente une surexpression de *TWIST1*, est un stade 4 défavorable SC. Il semble donc que la surexpression de *TWIST1* pourrait être corrélée au statut défavorable dans certains neuroblastomes Simple Copie et pourrait constituer un marqueur pronostic qu'il serait intéressant d'évaluer.

Age (j)	Statut	Stade	Histologie de Shimada	Tumeur	Expression relative			
					<i>N-MYC</i>	<i>TWIST1</i>	<i>c-MYC</i>	<i>TWIST2</i>
351	SC	1	favorable	1344	0,12	0,30	0,39	---
2983	SC	2a	défavorable	1963	0,42	0,18	3,24	0,02
1610	SC	2b	favorable	1652	0,01	9,34	8,45	---
2717	SC	2b	favorable	1236	0,05	1,20	2,10	1,12
72	SC	2b	favorable	1569	0,17	1,53	0,54	---
524	SC	2b	favorable	995	0,24	0,28	1,25	---
170	SC	2b	favorable	298	0,39	0,73	0,80	---
600	SC	2b	défavorable	1120	0,02	3,90	15,78	---
370	SC	3	favorable	980	0,12	2,06	1,07	---
374	SC	3	favorable	2008	0,30	0,35	2,28	0,01
227	SC	4	favorable	1698	0,41	0,63	1,34	---
1428	SC	4	défavorable	1050	0,08	0,12	0,88	0,22
1530	SC	4	défavorable	1000	0,35	14,52	0,72	0,73
1406	SC	4	défavorable	1754	0,42	0,23	1,85	---
1466	SC	4	défavorable	1998	0,52	0,31	5,11	---
3963	NMA	4	défavorable	1830	0,40	15,85	1,48	1,65
677	NMA	4	défavorable	1964	0,89	0,23	0,27	0,00
666	NMA	4	défavorable	1688	1,53	2,91	2,74	---
1157	NMA	4	défavorable	1570	13,38	14,72	29,46	---
765	NMA	4	défavorable	1840	14,14	4,78	3,70	---

Tableau 8 : Dérégulation de l'expression des gènes *MYC* & *TWIST* dans des tumeurs de neuroblastome

Expression analysée par RT-PCR quantitative. Les tumeurs sont classées en fonction du stade, de l'histologie de Shimada, du statut pour *N-MYC* et du niveau d'expression pour *N-MYC*.

Pour agrandir l'échantillonnage, nous avons établi une collaboration avec le Dr Jean Bénard (Institut Gustave Roussy, Paris) afin de disposer de 124 tumeurs de neuroblastome. Nous avons alors analysé, par RT-PCR quantitative, l'expression des gènes *N-MYC* et *TWIST1* (rapportée aux gènes de référence *CFL1* et *GAPDH*) dans ces 124 tumeurs tous stades confondus : 11 de stade 1, 13 de stade 2, 9 de stade 3, 17 de stade 4S et 74 de stade 4. Nous avons observé une corrélation significative entre l'expression des gènes *N-MYC* et *TWIST1* (Pearson : $R = 0,807$; $p < 2,2 \times 10^{-16}$), et ce, indépendamment du stade de la tumeur. Faute de matériel en quantité suffisante, nous n'avons pas pu analyser l'expression des gènes *c-MYC* et *TWIST2*.

Cette étude nous permet de conclure que, dans le neuroblastome, il existe une corrélation d'expression entre les gènes *N-MYC* et *TWIST1* indépendamment du stade et du statut *N-MYC* (Simple Copie ou *N-MYC* amplifié) mais également entre *c-MYC* et *TWIST1* dans certaines tumeurs Simple Copie.

2. Dérégulation de l'expression des gènes MYC et TWIST dans les cancers du colon et du sein

Afin de déterminer si la corrélation entre les gènes *MYC* et *TWIST* peut être observée dans d'autres tumeurs et notamment des carcinomes, nous avons analysé l'expression des gènes *N-MYC*, *c-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* par RT-PCR quantitative dans des échantillons de cancer du colon ($n = 10$) et de sein ($n = 14$) [Figure 21] (rapporté aux gènes de référence *ATP6AP1* et *UBB* pour le colon, *ACTB* et *CPB1* pour le sein). Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux corrélations possibles entre les gènes *c-MYC* et *TWIST* puisque la dérégulation de *c-MYC* est fréquemment observée dans les cancers du colon et du sein.

Nous observons une dérégulation de l'expression de *c-MYC* dans 9 sur 10 (90 %) tumeurs du colon et 9 sur 14 (64,3 %) tumeurs mammaires [Figure 21]. En revanche, *N-MYC* n'est pas exprimé dans ces tumeurs.

Nous remarquons que *TWIST1* (338, 336, 3125, 464, 2141, 1158 et 2464) et *TWIST2* (144, 338, 336, 3125, 464, 2141 et 1158) sont exprimés dans 7 sur 10 tumeurs du

colon [Figure 21A]. Dans les échantillons de cancer du sein, *TWIST1* est exprimé dans 8 sur 14 tumeurs (295, 56, 210, 245, 382, 149, 260 et 174) tandis que *TWIST2* est dérégulé dans 5 cas (295, 56, 210, 149 et 260) [Figure 21B].

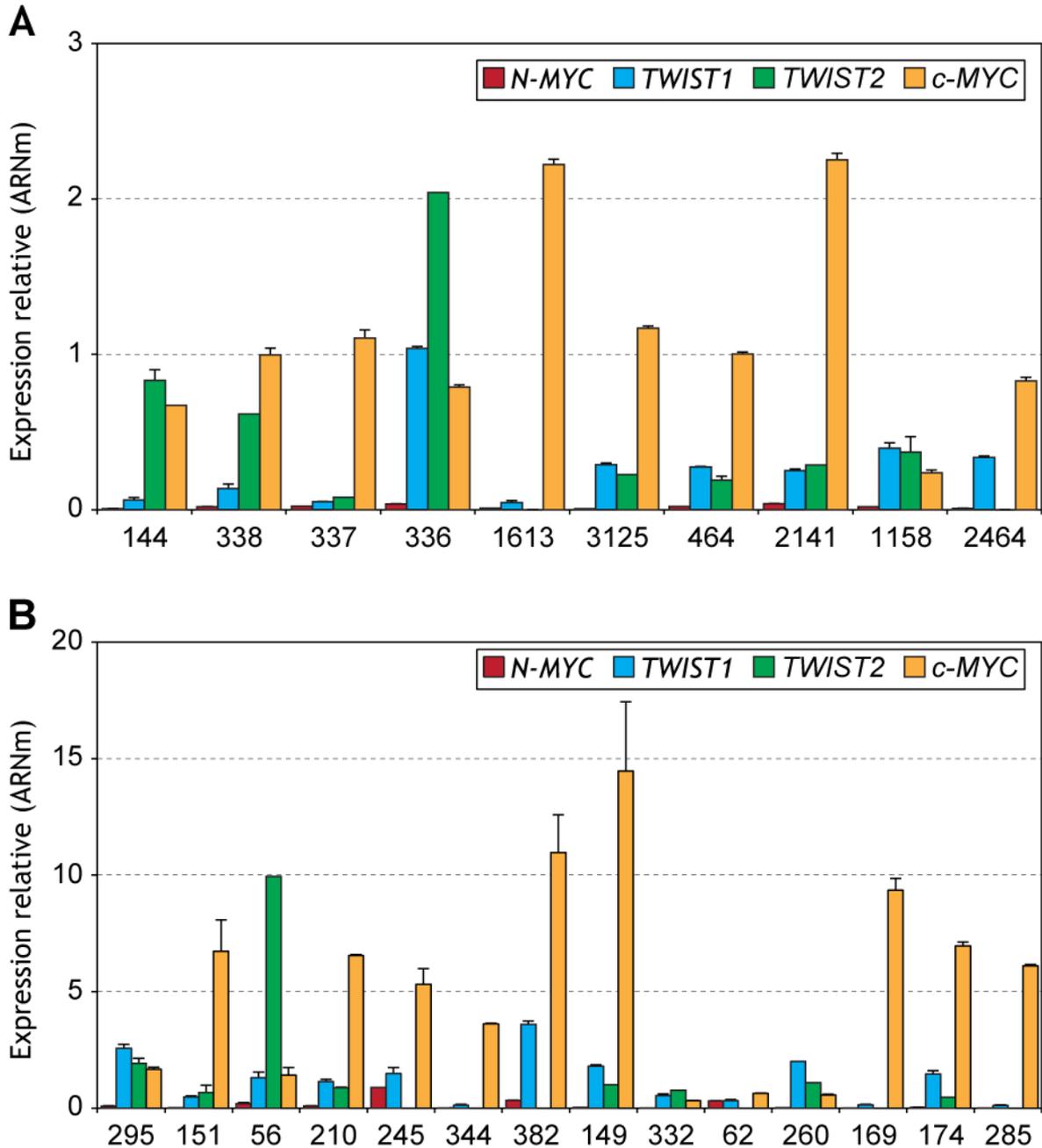


Figure 21 : Expression des gènes *MYC* & *TWIST* par RT-PCR quantitative dans les cancers du colon et du sein

Bien que les tumeurs qui expriment les gènes *TWIST* expriment également le gène *c-MYC*, il n'y a pas de corrélation d'expression entre ces deux familles de gènes dans le cancer du colon (A) et du sein (B).

Bien que certains échantillons expriment *TWIST1* et/ou *TWIST2*, nous ne constatons pas de corrélation d'expression *c-MYC* et les gènes *TWIST*. En effet, nous remarquons que plusieurs tumeurs de colon (337, 1613) et de sein (151, 210, 344, 169, 174 et 285) expriment *c-MYC* mais pas les gènes *TWIST*. En revanche, nous constatons que toutes les tumeurs surexprimant *TWIST1* et/ou *TWIST2* expriment également *c-MYC*.

Ceci suggère que même si la dérégulation de *c-MYC* semble nécessaire à celle des gènes *TWIST*, la surexpression de *c-MYC* n'induit pas systématiquement celle de *TWIST1* ou *TWIST2*. Par conséquent, la corrélation d'expression entre les gènes *N-MYC* et *TWIST1* retrouvée dans le neuroblastome ne peut pas être généralisable à tous les cancers notamment les carcinomes du colon et du sein ($p > 0,05$).

3. Modulation de l'expression des gènes MYC

a) Effets de la surexpression des gènes MYC sur l'expression des gènes TWIST dans le neuroblastome

Nous avons vu que l'expression de *TWIST1* était corrélée à celle des gènes *MYC* dans le neuroblastome. Pour déterminer si la modulation de l'expression des gènes *MYC* a un effet sur l'expression des gènes *TWIST1* et *TWIST2*, nous avons mis en place un modèle de surexpression des protéines Myc dans la lignée cellulaire de neuroblastome simple copie SHEP. Ces cellules ont été transfectées par deux doses (1 ou 2 μg) de plasmide codant pour le gène *N-MYC* ou *c-MYC*. L'expression des gènes *c-MYC*, *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* et *ODC* a été analysée par RT-PCR quantitative 24h après la transfection. Les résultats d'expression relative sont calculés par rapport au contrôle de transfection plasmide vide (PCI) [Figure 22]. Le gène de l'Ornithine Décarboxylase (*ODC*), cible directe des gènes *MYC*, a été utilisé comme contrôle positif (Bello-Fernandez et al., 1993; Lutz et al., 1996).

Dans la Figure 22A, nous observons une augmentation dose dépendante de l'expression des gènes *N-MYC* et *c-MYC* après transfection validant ainsi la surexpression ectopique de ces gènes.

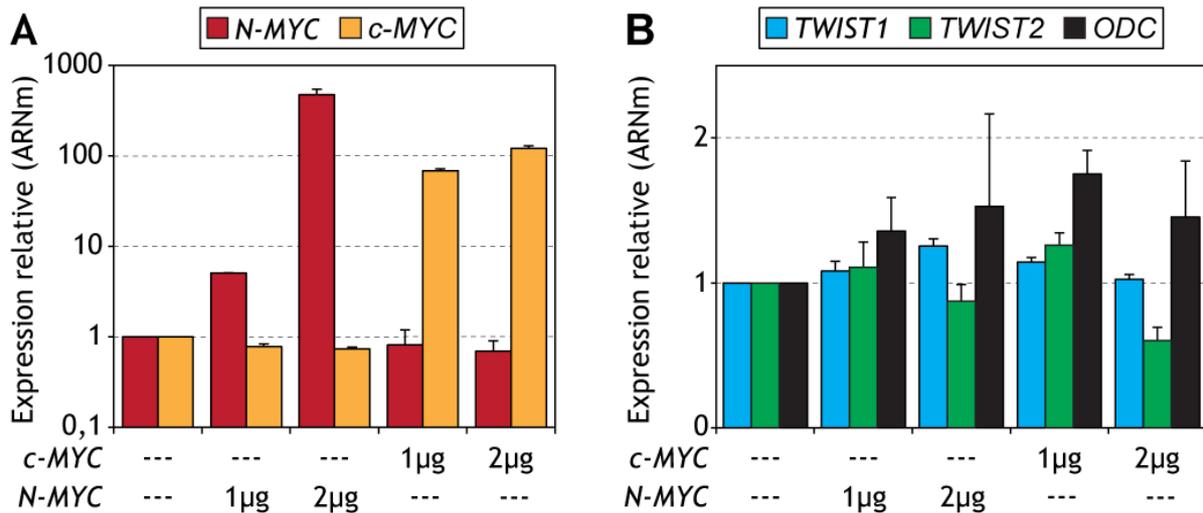


Figure 22 : Analyse par RT-PCR quantitative des effets de la surexpression ectopique des gènes *MYC* dans les cellules SHEP

(A) Validation de la surexpression des protéines Myc après transfection. **(B)** Dans la lignée de neuroblastome SHEP, 24h après transfection de 1 µg de plasmide *N-MYC* ou *c-MYC*, l'expression des gènes *TWIST1*, *TWIST2* et *ODC* est augmentée. Avec 2 µg, l'expression de *TWIST2* est réduite par rapport au contrôle plasmide (PCI) vide.

Nous constatons une augmentation de 1,5 à 2 fois de l'expression du contrôle positif *ODC* en fonction de la dose de protéines Myc [Figure 22B]. De même, l'expression de *TWIST1* est augmentée avec 1 µg de *c-MYC* et de façon dose dépendante avec 1 puis 2 µg de *N-MYC*. En revanche, avec 2 µg de *c-MYC*, il n'y a aucun effet sur *TWIST1*. Enfin, l'expression de *TWIST2* est augmentée avec 1 µg de plasmide *N-MYC* ou *c-MYC* et diminuée avec 2 µg.

Ces premiers résultats suggèrent que la surexpression des protéines Myc permet dans certaines conditions d'induire l'expression de *TWIST1* et *TWIST2*.

Afin d'évaluer la dynamique de modulation d'expression de ces gènes, nous avons utilisé le modèle cellulaire TET21N (Lutz *et al.*, 1996) [Tableau 7]. Cette lignée de neuroblastome Simple Copie permet l'expression du gène *N-MYC* sous le contrôle d'un promoteur « TET-OFF ». Lorsqu'elle est traitée avec de la tétracycline (1 µg/mL), *N-MYC* n'est pas exprimé. La levée du traitement permet l'induction de l'expression de *N-MYC*.

La lignée cellulaire TET21N a été utilisée pour des cinétiques d'induction de l'expression de *N-MYC*. Les cellules sont traitées pendant 48h avec de la tétracycline (1 µg/mL) puis lavées avant de débiter la cinétique. L'expression des

gènes *N-MYC*, *TWIST1*, *TWIST2* et *ODC* est analysée par RT-PCR quantitative et rapportée au temps $t = 0h$ qui correspond à la fin du traitement à la tétracycline.

Comme attendu, l'arrêt du traitement induit l'expression de *N-MYC* [Figure 23]. Nous observons une activation de 1.5 fois de l'expression d'*ODC*, cible directe des protéines Myc, dès 4h.

Nous observons que *TWIST2* présente un profil similaire à *ODC* avec une activation de 2 fois dès 4h et un pic d'expression à 12h [Figure 23]. Cependant, l'expression de *TWIST2* est diminuée à partir de 20h pour revenir à un niveau basal vers 24-28h alors que celle d'*ODC* est maintenue.

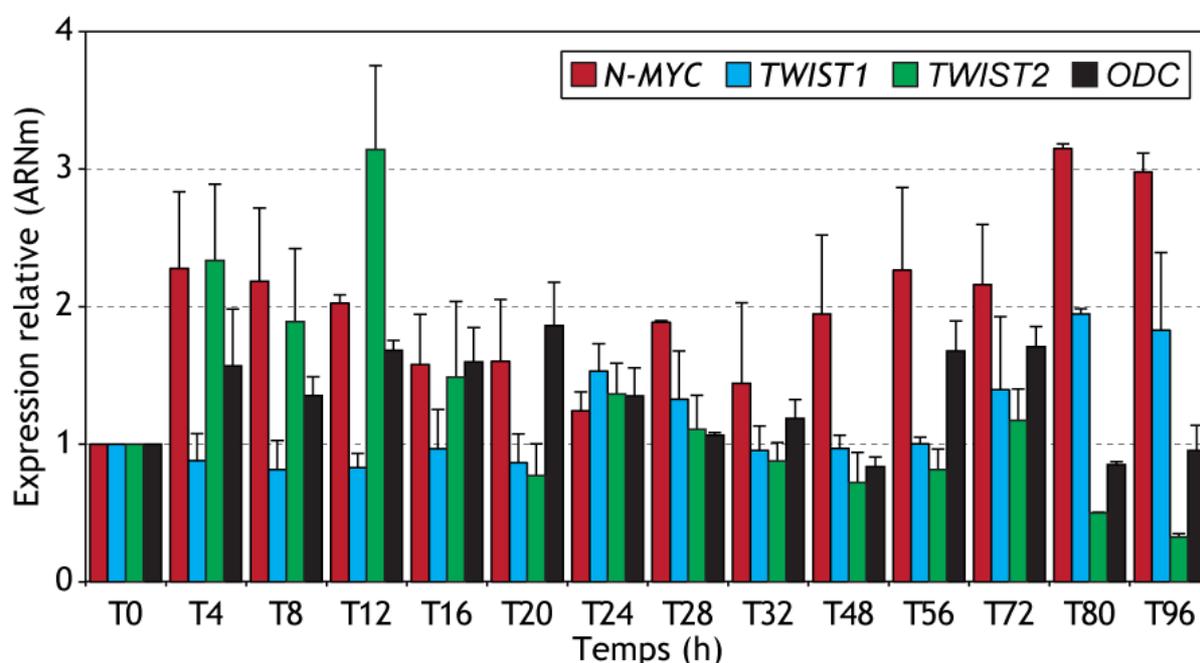


Figure 23 : Analyse par RT-PCR quantitative de cinétiques d'induction de *N-MYC* dans les cellules TET21N

L'arrêt du traitement à la tétracycline induit l'expression de *N-MYC*. Elle est suivie de l'induction de *TWIST2* et *ODC* dès 4h. L'expression de *TWIST1* est d'abord stable puis atteint un premier pic à 28h et un second après 72h.

En ce qui concerne *TWIST1*, nous remarquons que son expression n'est pas induite voire diminuée avant 16 heures [Figure 23]. Elle est augmentée à partir de 24h avec un premier pic vers 24-28h, diminue de 32 à 56h puis augmente à nouveau après 72h.

Ces résultats suggèrent que *TWIST2* pourrait être comme *ODC* une cible directe de *N-MYC* puisque l'induction de son expression est rapide dès 4h alors que *TWIST1* pourrait être une cible indirecte de *N-MYC*.

Cette étude de la surexpression des gènes *MYC* suggère que les gènes *TWIST1* et *TWIST2* peuvent être induits par les protéines Myc. Elle met également en évidence que les protéines Myc réguleraient différemment l'expression de *TWIST1* et *TWIST2*, le premier étant activé plus tardivement que la cible directe *ODC*, et le second étant activé dès 4h mais diminué à forte dose. Ces conclusions suggèrent que la relation entre les oncoprotéines Myc et les gènes *TWIST1* et *TWIST2* seraient différentes. *TWIST1* pourrait être une cible transcriptionnelle indirecte tandis que *TWIST2* pourrait être une cible directe des protéines Myc.

b) Effets de l'inhibition de l'expression de *N-MYC* sur l'expression des gènes *TWIST* dans le neuroblastome

Ayant observé que la surexpression des protéines N-Myc induit l'expression des gènes *TWIST*, nous avons voulu déterminer si l'expression de *N-MYC* est nécessaire pour le maintien de l'expression des gènes *TWIST*. L'expression du gène *N-MYC* a été inhibée par interférence ARN dans la lignée de neuroblastome WAC. Celle-ci correspond à la lignée Simple Copie pour *N-MYC*, SHEP, transfectée avec un plasmide permettant une expression 100 fois plus importante de *N-MYC* que dans les cellules SHEP [Tableau 7]. La lignée WAC exprime également *TWIST1* et *TWIST2*.

Après transfection, nous avons évalué l'expression des gènes *N-MYC*, *c-MYC*, *TWIST1*, *TWIST2* et *ODC* par RT-PCR quantitative à 24, 48 et 72h. L'expression de ces gènes a été rapportée à celle observée dans les cellules transfectées avec le siRNA « *scramble* ».

Nous observons une inhibition de l'expression de *N-MYC* de 75 % à 24h, 82 % à 48h et quasi 100 % à 72h indiquant que le siRNA *N-MYC* utilisé est efficace [Figure 24]. La première constatation est que l'expression de *c-MYC* est induite en réponse de l'inhibition de *N-MYC*. Il apparaît également que l'expression de *TWIST2* est

diminuée à 48 et 72h. Enfin, il n'y a aucun effet sur *ODC* et *TWIST1* à 24 et 48h mais ils sont induits à 72h.

Cette expérience révèle ainsi la capacité de répression de *N-MYC* sur *c-MYC*, déjà décrite dans la littérature (Breit and Schwab, 1989). Il apparaît également que *c-MYC* prendrait le relais de *N-MYC* pour maintenir l'expression des gènes *TWIST1* et *ODC* notamment à 72h. En revanche, *c-MYC* n'arriverait pas à compenser les effets de la perte de *N-MYC* sur l'expression de *TWIST2*. Ceci confirme notamment nos précédentes conclusions quant à la relation différente des gènes *MYC* avec *TWIST1* et *TWIST2*.

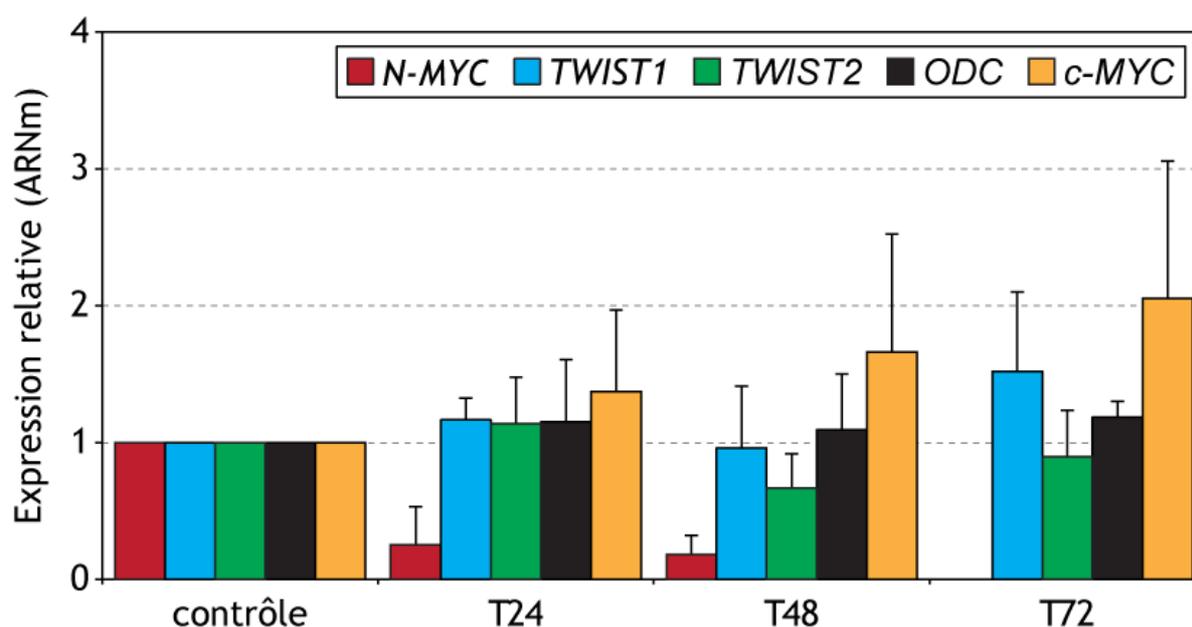


Figure 24 : Analyse par RT-PCR quantitative de l'inhibition de l'expression de *N-MYC* dans les cellules WAC

L'inhibition de l'expression de *N-MYC* par siRNA dans la lignée de neuroblastome WAC induit une augmentation de l'expression de *c-MYC* dès 24h et de *TWIST1* et *ODC* à 72h. L'expression de *TWIST2* est inhibée à 48 et 72h.

Afin d'étayer d'avantage nos observations, nous avons utilisé le modèle TET21N pour des cinétiques de répression de *N-MYC*. Pour ce faire, les cellules TET21N sont traitées avec de la tétracycline (1 µg/mL). La cinétique commence lors du début du traitement. Le milieu est changé tous les jours pour maintenir le traitement.

Nous avons analysé et rapporté l'expression des gènes *N-MYC*, *c-MYC*, *TWIST1*, *TWIST2* et *ODC* par rapport au temps $t = 0h$, par RT-PCR quantitative

jusqu'à 88h après le début du traitement à la tétracycline des cellules TET21N. Nous constatons que l'inhibition de *N-MYC* s'accompagne d'une augmentation de l'expression de *TWIST1* dès 16h [Figure 25]. L'expression de *TWIST1* est ensuite maintenue tout au long de cette cinétique. A l'inverse, il apparait que l'expression de *TWIST2* et *ODC* est diminuée en réponse à la perte d'expression de *N-MYC* et ce, durant toute la cinétique. Enfin, *c-MYC* présente un profil particulier puisqu'il est d'abord induit à 16h puis inhibé d'environ 50 % à 24 et 40h et totalement à partir de 48h.

Ces résultats indiquent que l'inhibition de *N-MYC* induit dans les premières heures *c-MYC* et *TWIST1* dont le maintien de l'expression semble indépendant des facteurs Myc. En revanche, le maintien de l'expression de *TWIST2* et *ODC* serait assuré par *N-MYC*.

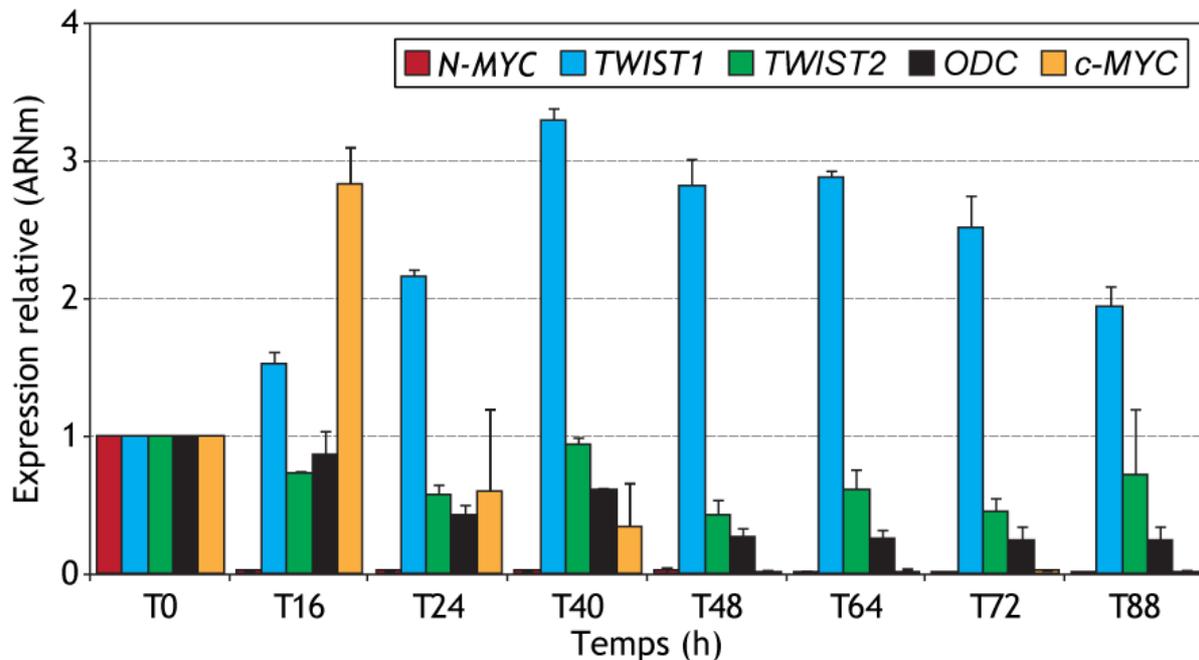


Figure 25 : Analyse par RT-PCR quantitative de cinétiques de répression de *N-MYC* dans les cellules TET21N

L'expression de *N-MYC* est réprimée par traitement de la lignée TET21N avec de la tétracycline pendant 88h. L'expression de *c-MYC* est d'abord augmentée à 16h puis diminue. *TWIST1* est induit pendant toute la cinétique. L'expression de *TWIST2* et d'*ODC* est diminuée pendant toute la cinétique.

Ces expériences d'inhibition d'expression de *N-MYC* suggèrent toutes deux que la perte d'expression de *N-MYC* pourrait induire *c-MYC* et *TWIST1* et inhiber *TWIST2* et *ODC*. En revanche, alors que l'inhibition de *N-MYC* par ARN interférence suggère que l'expression de *TWIST1* serait maintenue par *c-MYC*, les résultats de la

cinétique de répression montre le contraire. Il s'agit de systèmes différents, chacun présentant des biais expérimentaux (transfection, utilisation de drogues,...) qui ne nous permettent donc pas de conclure définitivement quant aux liens transcriptionnels entre ces oncoprotéines.

4. Fixation des protéines Myc sur les boites E de *TWIST1*

A partir des observations précédentes, suggérant que les gènes *TWIST* pourraient être des cibles transcriptionnelles des protéines Myc, nous avons cherché à déterminer si les protéines Myc régulaient directement les gènes *TWIST*.

Nous avons alors analysé *in silico*, le promoteur du gène *TWIST1* et avons identifié plusieurs éléments de fixation pour les protéines Myc (boites E de séquence CANNTG) [Figure 26].



Figure 26 : Promoteur du gène *TWIST1*

La région promotrice de *TWIST1* (+1 à -2000) contient une boîte TATA, et 4 boîtes E : E1, E2, E3 et une boîte E non consensus.

Afin de déterminer si *TWIST1* est un gène cible des protéines Myc nous avons effectué des expériences de gel retard (EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay) avec des extraits protéiques nucléaires de plusieurs lignées de neuroblastome. Nous avons utilisé les lignées SHEP, WAC, SK-N-SH et IGRN91 parce qu'elles représentent différents types de neuroblastome avec différents profils concernant l'expression des gènes *c-MYC*, *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2*. La lignée IGRN91 est issue d'un neuroblastome *N-MYC* Amplifié qui exprime *N-MYC* et *TWIST1*. La lignée SK-N-SH est Simple Copie pour *N-MYC*, elle exprime *c-MYC* et *TWIST1*. La lignée SHEP, SC, présente une faible expression de *c-MYC* et de *TWIST2* ainsi qu'une plus faible expression de *TWIST1* que SK-N-SH et IGRN91. Enfin, la lignée WAC correspond à la lignée SHEP contenant un plasmide permettant la surexpression de *N-MYC*. Elle exprime également *TWIST1* et *TWIST2*.

Cinq sondes biotinylées en 3' et non marquées représentant différentes parties du promoteur *TWIST1* ont été utilisées : E1, E2, E3, « non consensus » et INR (voir partie matériel & méthodes). Les sondes E1, E2 et E3 contiennent chacune une boîte E respectivement CAGCTG, GTGCAC et CACGTG. La sonde « non consensus » comprend une boîte E non consensus de séquence CACGCG sur laquelle les protéines Myc peuvent se fixer également (Zeller et al., 2001; Kim et al., 2004; Sitcheran et al., 2005; Beierle et al., 2007). La sonde INR correspond à l'élément INR du promoteur *TWIST1* [Figure 26].

Pour les expériences de gel retard, les extraits protéiques nucléaires des différentes lignées sont utilisés pour des réactions d'hybridation avec les sondes biotinylées (pistes 2a) ainsi qu'avec les sondes biotinylées et un excès de sondes non marquées (pistes 3). La comparaison de ces deux pistes (pistes 2a et 3) avec la condition sondes biotinylées seules (sans extraits protéiques, piste 1) permet de mettre en évidence un « shift » (ou retard de migration) indiquant la présence de protéines capables de s'hybrider avec les sondes [Figure 27].

Afin de mettre en évidence la présence des protéines Myc dans les complexes protéiques capables de s'hybrider avec les sondes biotinylées, les extraits protéiques nucléaires ont été pré-incubés avec 0,5 µg d'anticorps dirigé contre N-Myc ou c-Myc pendant 20 min à température ambiante. Les extraits pré-incubés ont été utilisés pour des réactions d'hybridation avec les sondes biotinylées (pistes 2B et 2C) [Figure 27]. Nous nous attendions à ce que les anticorps s'ajoutent aux complexes qui s'hybrident aux sondes biotinylées et induisent ainsi un retard sur gel plus important que sans anticorps : « supershift ».

Mais, en comparant la réaction avec sonde biotinylée et extraits protéiques (pistes 2A) aux conditions contrôle (piste 1 et 3), nous constatons, pour la combinaison lignées IGRN91 et SHEP et sonde INR, plusieurs bandes dont l'intensité diminue lorsque les extraits sont pré-incubés avec un anticorps anti-N-Myc (piste 2B) ou anti-c-Myc (piste 2C) [Figure 27A et B]. Un résultat similaire est observé pour la bande obtenue (piste 2B) avec la lignée SK-N-SH et la sonde E1 [Figure 27C]. Ainsi, il apparaît qu'au lieu de s'ajouter au complexe formé par la liaison

protéine nucléaire-ADN, les anticorps utilisés dirigés contre N-Myc et c-Myc empêcheraient la fixation des protéines Myc à l'ADN.

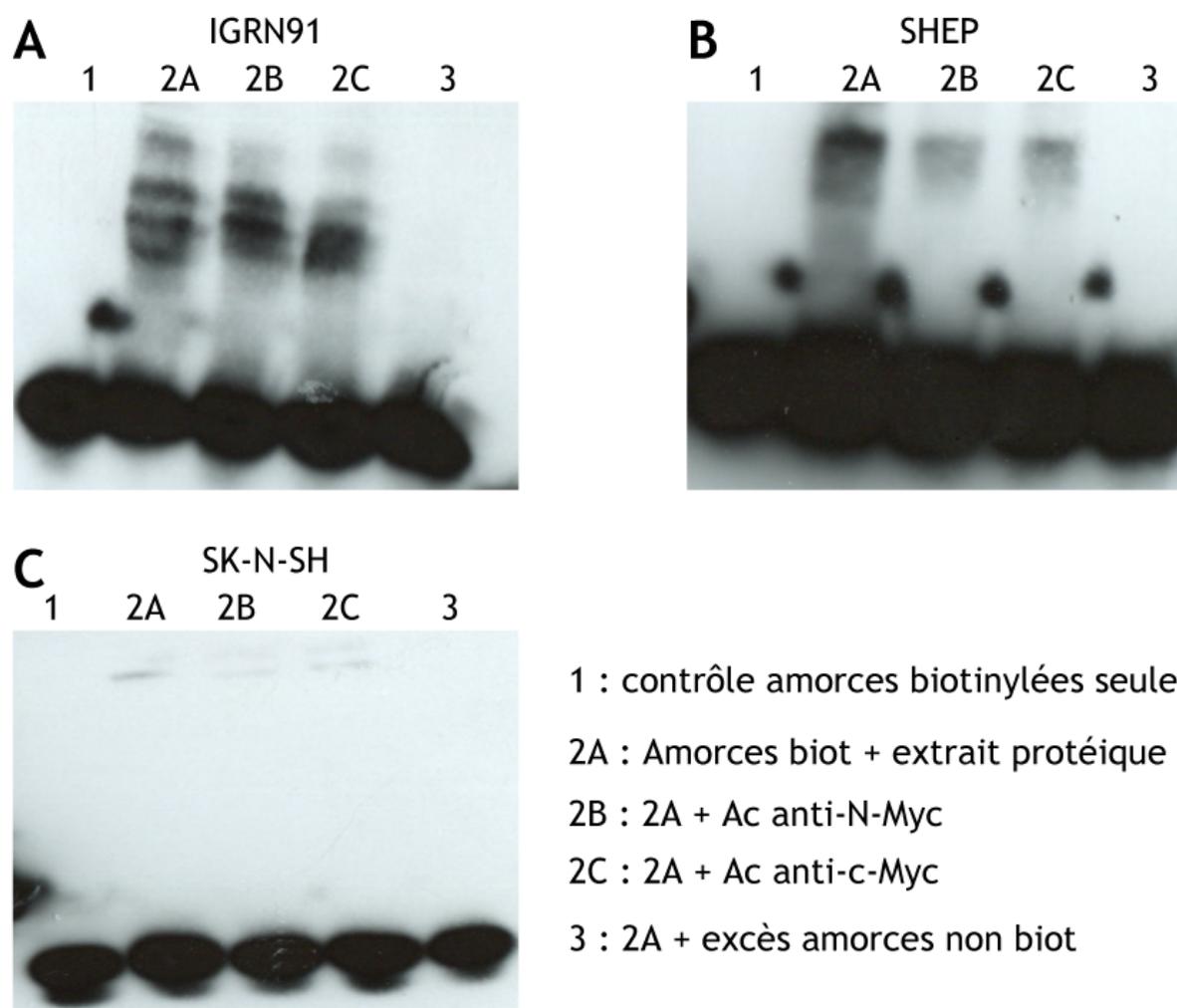


Figure 27 : Gels retard

Expériences de gel retard avec utilisation d'anticorps dirigés contre c-Myc et N-Myc. Avec la sonde INR, des bandes sont observées avec les extraits nucléaires protéiques des lignées IGRN91 (A) et SHEP (B). L'ajout d'Ac provoque une diminution de l'intensité des bandes supérieures. Dans la lignée SK-N-SH (C), un résultat similaire est observé avec la sonde E1.

Ces résultats indiquent que les protéines N-Myc et c-Myc pourraient se fixer à la boîte E1 et à l'INR du promoteur du gène *TWIST1*, c'est-à-dire aussi bien à un élément d'activation transcriptionnel (E1) qu'un élément de répression du promoteur (INR).

Des expériences similaires ont été réalisées avec les trois autres sondes E2, E3 et « non consensus » et les extraits protéiques nucléaires des lignées SHEP, IGRN91 et SK-N-SH. Pour ces trois sondes, nous n'avons pas pu mettre en évidence

la présence des protéines Myc dans les complexes protéiques qui se fixaient aux sondes. Cette absence de résultat pourrait être due à un biais technique et/ou à une affinité plus faible pour ces sites des protéines Myc.

5. Activation du promoteur *TWIST1* par les protéines Myc

Afin de montrer que les protéines Myc qui se fixent sur le promoteur *TWIST1* peuvent l'activer, nous avons utilisé le système reporteur pGL3-enhancer pour étudier l'activation de différentes parties du promoteur de *TWIST1*. Différents segments du promoteur ont été clonés dans le plasmide pGL3 pour obtenir les constructions pGL3 suivantes : 1E-boxS, 1E-boxAS, minimum, et 2E-box [Figure 28]. La région promotrice « 1E-box » a servi pour deux constructions en fonction du sens d'insertion de l'insert : 1E-boxS (sens) et 1E-boxAS (antisens).

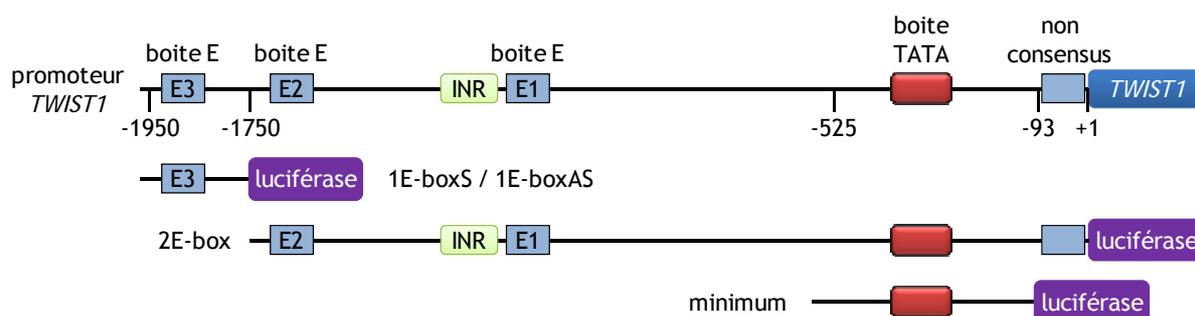


Figure 28 : Constructions pGL3

La région promotrice « 1E-box » a servi pour deux constructions en fonction du sens d'insertion de l'insert : 1E-boxS (sens) et 1E-boxAS (antisens). La boîte E contenue dans ce fragment a été mutée pour donner deux constructions 1E-boxS mut et 1E-boxAS mut.

Les différentes constructions pGL3 (1E-boxS, 1E-boxAS, minimum, et 2E-box), pODC et le vecteur vide pGL3-vide sont co-transfectées avec les plasmides d'expression de N-Myc ou c-Myc et le plasmide pRL-TK. La construction pODC, contenant le promoteur du gène *ODC*, a été utilisée comme contrôle positif. Le plasmide pRL-TK est un plasmide contrôle, fourni avec le kit *Dual Luciferase* (Promega), qui code pour la luciférase *renilla*. L'activité luciférase *renilla* sert de calibrateur pour calculer l'activité luciférase spécifique de la construction d'intérêt testée.

Au bout de 24h, les cellules sont récoltées et utilisées pour des tests *Dual luciferase* pour doser le rapport de l'activité luciférase firefly (activité des constructions pGL3 ou pODC) sur celle de la luciférase renilla (activité du plasmide pRL-TK). Ce premier ratio obtenu pour chaque construction pGL3 est ensuite rapporté à celui du contrôle plasmide pGL3 vide [Figure 29].

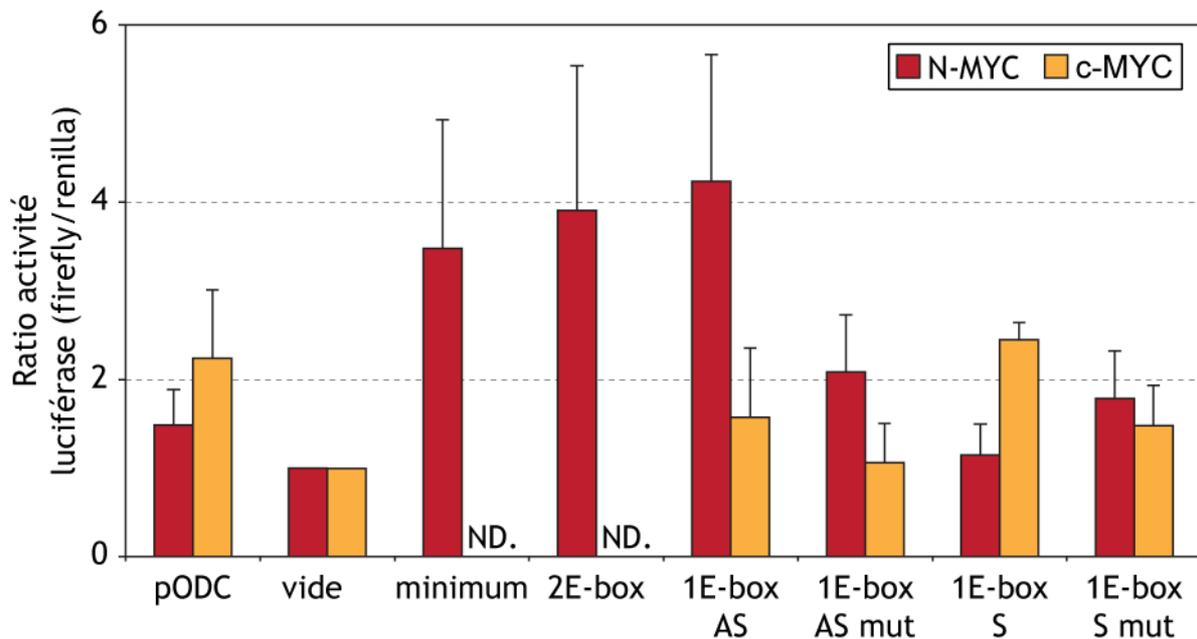


Figure 29 : Tests luciférase

24h après co-transfection des constructions pGL3 et des plasmides *c-MYC* ou *N-MYC*, l'activité luciférase est calculée en fonction de l'activité du plasmide pGL3 vide.

En présence de protéines N-Myc ou c-Myc, une activation significative d'environ 2 fois, de l'activité du promoteur contrôle pODC est constatée confirmant la validité du système [Figure 29]. En ce qui concerne les constructions véhiculant les régions du promoteur *TWIST1*, nous observons une activation significative en réponse à la transfection de *N-MYC*, pour les constructions « minimum », 2E-box et 1E-boxAS [Figure 29]. En revanche pour la construction 1E-boxS, une activation significative est observée en réponse à c-Myc mais pas N-Myc.

En ce qui concerne la construction 2E-box, les résultats obtenus sont en accord avec ceux des gels retard puisque nous avons vu précédemment que les protéines Myc étaient capables de se lier aux éléments E1 et INR contenus dans cette région. Quant à la construction minimum, il est probable que la boîte TATA,

dépourvue de tout autre élément de régulation négatif comme positif, autorise une activation constitutive.

L'activation de la construction 1E-boxS par les protéines c-Myc, comme celle de 1E-boxAS suggèrent que la boîte E3 contenue dans les constructions 1E-boxS et 1E-boxAS est capable de fonctionner dans les deux orientations avec une grande efficacité en antisens pour N-Myc et en sens pour c-Myc. Dans la configuration normale, ces boîtes doivent être tributaires d'autres facteurs et du contexte nucléotidique environnant.

Pour déterminer si l'activation des régions promotrices est due aux boîtes E, la boîte E3 des constructions 1E-boxS et 1E-boxAS a été mutée de CACGTG en CACGGT par mutagenèse dirigée.

Nous constatons une baisse significative de plus de 2 fois de l'activité du promoteur en réponse à N-Myc et c-Myc pour la construction 1E-boxAS mut et en réponse à c-Myc pour la construction 1E-boxS mut [Figure 29]. Ces résultats confirment le rôle essentiel de ces boîtes E dans la liaison et l'activation du gène *TWIST1* par les facteurs Myc. De manière intéressante, il apparaît que la mutation de la boîte E3 dans la construction 1E-boxS mut permet son activation en réponse avec N-Myc contrairement à la version sauvage.

Ces résultats confirment la capacité des protéines N-Myc et c-Myc à activer le promoteur de *TWIST1* et à permettre ainsi l'expression du gène. Ils indiquent également que l'activation du promoteur de *TWIST1* par les protéines Myc est dépendante des boîtes E même à longue distance puisque la boîte E3 des constructions 1E-box se trouve à presque 2 kb de l'origine dans la configuration naturelle.

Dans cette partie consacrée aux gènes *MYC* et *TWIST*, nous avons montré que dans le neuroblastome l'expression du gène *N-MYC* et celle de *TWIST1* étaient corrélées indépendamment du stade et du statut *N-MYC*, et, que dans certains neuroblastomes Simple Copie, la dérégulation des gènes *TWIST* était corrélée à l'expression de *c-MYC* [Tableau 7 ; Tableau 8]. Néanmoins, nous avons conclu que

cette corrélation n'était pas retrouvée dans les carcinomes notamment les cancers du sein et du colon.

Ainsi, l'ensemble de nos données expérimentales suggèrent que l'expression des gènes *TWIST* pourrait être régulée par les protéines Myc. Ainsi, *TWIST2* serait une cible transcriptionnelle directe des protéines Myc. En revanche, en réponse aux protéines Myc, l'activation de *TWIST1* est plus tardive que *TWIST2* et *ODC*. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce délai :

- soit *TWIST1* est une cible indirecte et nécessite la synthèse d'un intermédiaire, cible directe de Myc qui viendrait dans une seconde étape activer l'expression de *TWIST1*
- soit *TWIST1* est une cible directe mais la présence d'un complexe répresseur puissant sur le promoteur nécessiterait une certaine quantité de protéines Myc pour lever la répression, donc un effet dose.

Au vu de l'ensemble de nos résultats, nous penchons plutôt pour cette deuxième hypothèse. En effet, nos résultats indiquent :

- que les protéines Myc sont capables de se fixer sur le promoteur de *TWIST1*
- qu'une activation directe est obtenue dans le système plasmide reporteur luciférase

Ainsi, nos travaux suggèrent que les gènes *TWIST1* et *TWIST2* seraient des cibles directes des protéines Myc. Dans le neuroblastome, la dérégulation des gènes *MYC* et plus particulièrement les amplifications de *N-MYC* pourraient être directement responsables de la surexpression de *TWIST1*.

B. Modèle de progression Tumorale

Afin d'étudier le rôle des gènes *MYC* et *TWIST* dans les étapes précoces de la tumorigenèse du neuroblastome, nous avons pour objectif de développer un modèle de progression tumorale. Ne disposant pas de neuroblastes humains, ni de cellules souches à l'origine des neuroblastes, nous avons évalué, en collaboration avec le Dr Maguer-Satta, la possibilité d'utiliser des cellules souches adultes dérivées de tissu adipeux (ADAS) pour ce modèle. Ces ADAS sont capables de se différencier en différents types cellulaires dont les lignages neuraux (Safford et al., 2004; Safford et al., 2002).

1. Extraction des cellules ADAS

Lors de liposuccions, le tissu adipeux abdominal prélevé est considéré comme un déchet opératoire et ne présente pas d'intérêt clinique. Par conséquent, en comparaison de biopsies ou d'autres dons pour la recherche, l'obtention et l'utilisation de ces prélèvements de tissu adipeux sont relativement simples. Les prélèvements nous ont été fournis par le Dr Delay (Centre Léon Bérard) après avoir obtenu le consentement des patientes.

A la réception des prélèvements, après différentes phases de digestion enzymatique des tissus, centrifugations et filtrations, les érythrocytes sont lysés et les cellules non adipeuses sont extraites. Ces dernières sont mises en culture en condition non adhérentes dans des flasques ou boîtes de Petri non traitées pour la culture cellulaire. Dans ces conditions, les cellules ADAS qui ont des caractéristiques de souches/progénitrices survivent et sont cultivables sous la forme de sphères de cellules [Figure 30].

Pour cultiver, maintenir et amplifier ces sphères nous avons d'abord du mettre au point les conditions de culture adéquates. Pour ce faire, nous avons testé différents protocoles utilisés pour la culture de mammosphères à partir du tissu adipeux mammaire ou de neurosphères extraites chez la souris ou à partir du Système Nerveux Central (Dontu et al., 2004). Les différents tests entrepris ont servi à déterminer la composition du milieu de culture qui permet le maintien et

l'amplification des sphères jusqu'à 4 passages. Ce milieu a pour base le DMEM F12 (ou MEMB) complété avec du B27 (substitutif du sérum de veau foetal), des facteurs de croissance (bFGF et EGF) et de l'héparine.

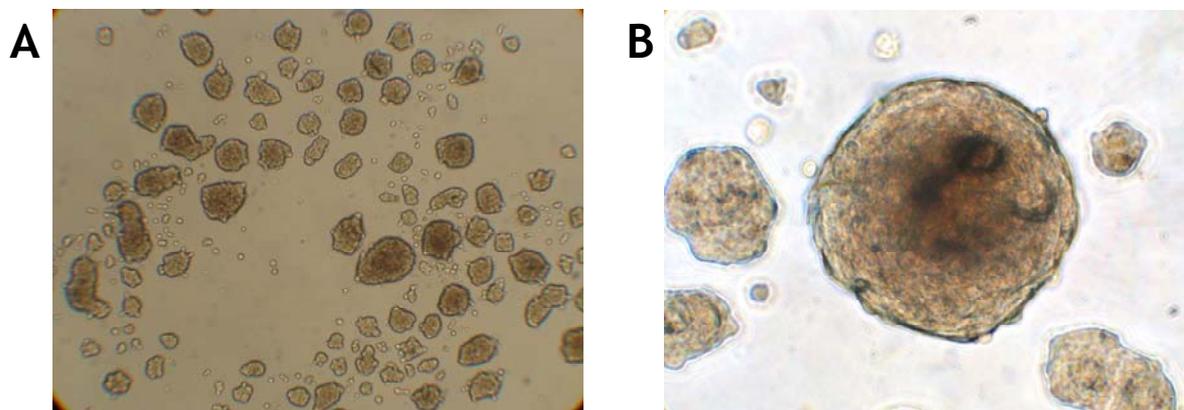


Figure 30 : Photos de sphères de cellules ADAS
Photos (A) d'un ensemble de sphères et (B) d'une sphère de cellules ADAS isolées de prélèvements de tissu adipeux.

2. Caractérisation phénotypique des cellules ADAS

Afin de savoir si les cellules extraites du tissu adipeux étaient bien des cellules ADAS, il nous fallait déterminer leur phénotype par cytométrie en flux ou RT-PCR quantitative.

Le phénotype des cellules des sphères a d'abord été caractérisé par cytométrie en flux le jour du prélèvement (J0 ou P0), ainsi qu'après le premier passage (P1) afin de suivre son évolution [Tableau 9]. A P0, les échantillons analysés (n = 10) expriment les marqueurs caractéristiques des cellules ADAS CD29 (47,27 %), CD10 (10,99 %) et CD90 (43,29 %) ainsi que le marqueur des cellules mésenchymales souches (MSC) CD73 (33,46 %). En revanche, ces cellules n'expriment pas les marqueurs mammaires EpCAM (0 %) et Muc1 (0,45 %), ni érythrocytaires GPA (1,35 %), ni le CD133 (0 %) considéré comme un marqueur des cellules souches ou progénitrices. Malgré l'absence de CD133, la présence des marqueurs CD10, CD29, CD90 et CD73 indique que les sphères à P0 contiendraient des cellules ADAS.

Marqueur	Moyenne à P0 (Min-Max)	Moyenne à P1 (Min-Max)
CD133	0	0
ABCG2	2,68 (0,45-7,24)	-
CXCR4	0	-
GPA	1,35 (0-3,67)	-
Muc1	0,45 (0-1,66)	-
EpCAM	0	-
CD24	2,13 (0-8,04)	-
CD29	47,27 (13,95-89,06)	-
CD49f	9,79 (0,05-24,35)	-
CD10	10,99 (0,53-21,19)	23,96 (1,37-49,71)
CD90	43,29 (26,43-68,96)	29,94 (21,38-44,48)
CD15	3,82 (2-6,93)	39
CD105	6,36 (2,86-10,41)	26,95 (24,2-32,98)
CD73	33,46 (0-63,98)	34,56 (23,8-51,3)
CD130		0

Tableau 9 : Phénotype des ADAS par cytométrie en flux

Les cellules isolées expriment les marqueurs caractéristiques des cellules ADAS. Elles n'expriment pas les marqueurs mammaires, ni érythrocytaires ni le CD133.

A P1, les cellules de sphères présentent un phénotype différent [Tableau 9]. En effet, l'expression de plusieurs marqueurs est augmentée par rapport à P0 : mésenchymaux CD15 (39 au lieu de 3,82 %) et CD105 (26,95 au lieu de 6,36 %) ainsi que celui des ADAS CD10 (23,96 au lieu de 10,99 %). En revanche, nous constatons que l'expression de CD90 est diminuée passant de 43,29 à 29,94 %. L'augmentation globale des marqueurs des MSC et des ADAS suggère un maintien voire un enrichissement des sphères en cellules souches ou progénitrices. Néanmoins, comme il apparaît que toutes les cellules n'expriment pas les marqueurs des MSC et ADAS, les sphères seraient composées de plusieurs types cellulaires. L'hypothèse la plus souvent avancée est que la formation des sphères (neurosphères et mammosphères) est initiée par des cellules souches/progénitrices telles que les ADAS ou les MSC et que celles-ci pourraient faire croître les sphères par auto-renouvellement mais aussi par mitose asymétrique donnant des cellules plus différenciées à l'origine de l'hétérogénéité des sphères.

Pour affiner la caractérisation phénotypique des sphères, l'expression de plusieurs gènes, pour leurs caractéristiques reconnues, a été analysée par RT-PCR quantitative : *BMI1* (auto-renouvellement), *Nanog* (pluripotence), *Nestine* et *PAX3* (marqueurs neuraux), *OCT4* (cellules souches) et *TWIST1* [Figure 31]. Nous constatons qu'au fil des passages (P0, P1, P2), l'expression des marqueurs « souches » *BMI1*, *OCT4* et *Nanog* diminue. En revanche, les niveaux d'expression des marqueurs de la différenciation neurale *PAX3* et *Nestine* mais aussi *TWIST1* augmentent de P0 à P2. Ces observations indiquent qu'au fil des passages (P0, P1 et P2), la composition des sphères change : la proportion de cellules différenciées ou en cours de différenciation augmente. De plus, il apparaît qu'au moins une partie non négligeable des cellules, en se différenciant, s'engage dans le lignage neural.

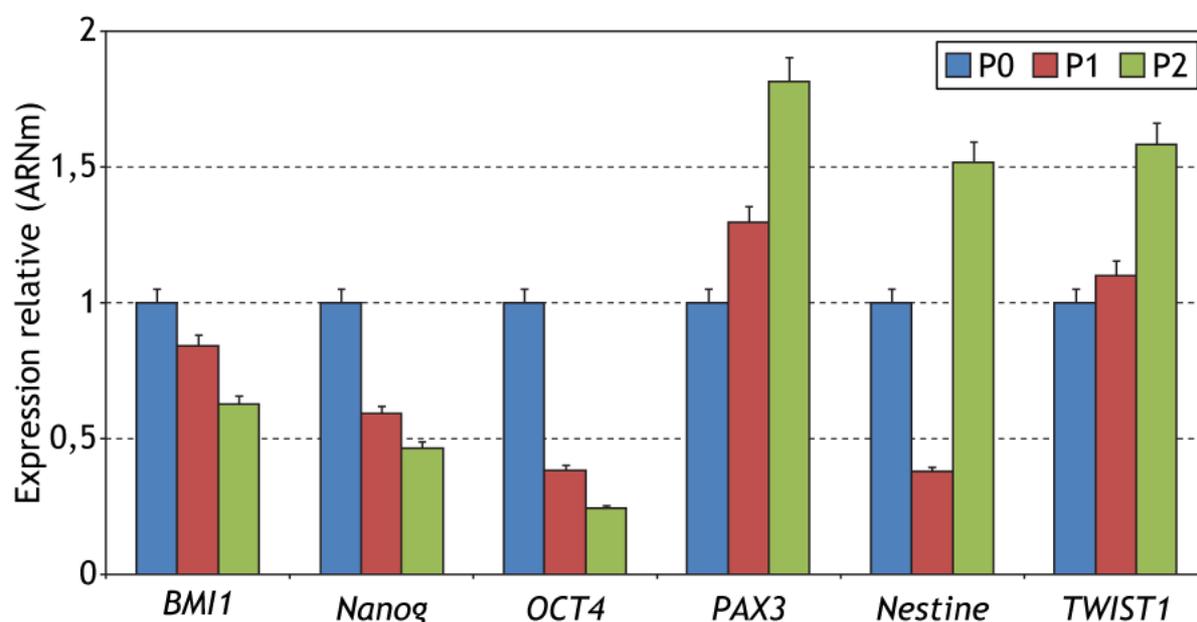


Figure 31 : Profil d'expression des cellules ADAS

Analyse par RT-PCR quantitative des gènes *BMI1*, *Nanog*, *OCT4*, *PAX3*, *Nestine* et *TWIST1*. L'expression des marqueurs « souches » *BMI1*, *Nanog* et *OCT4* diminue au fil des passages. A l'inverse, celle des marqueurs de la différenciation neurale *PAX3* et *Nestine* augmente, ainsi que celle de *TWIST1*.

La caractérisation phénotypique par cytométrie en flux et par RT-PCR quantitative des cellules isolées des prélèvements de tissu adipeux indique que ces cellules possèdent les caractéristiques des cellules ADAS. Ces données suggèrent que nos sphères contiendraient des ADAS et que la proportion de cellules ADAS

diminuerait au fil des passages en faveur de cellules en cours de différenciation dont parmi celles-ci des cellules engagées dans la différenciation neurale.

3. Différenciation des cellules ADAS

Les cellules ADAS ont été décrites comme pouvant se différencier en différents types cellulaires : hépatique, épithélial, neural (Zuk et al., 2001; Safford et al., 2002; Zuk et al., 2002; Kang et al., 2004; Safford et al., 2004; Brzoska et al., 2005; Fraser et al., 2006; Kang et al., 2006; Talens-Visconti et al., 2007). Or, nos propres observations suggèrent un potentiel de différenciation des cellules ADAS. Le groupe du Dr Maguer-Satta ayant l'expérience de plusieurs protocoles de différenciation, nous avons décidé d'utiliser les cellules de sphères pour des tests de différenciation en culture 2D (2 dimensions) et 3D (3 dimensions) afin de savoir si les cellules que nous avons extraites des tissus adipeux possédaient bien les propriétés de différenciation des ADAS.

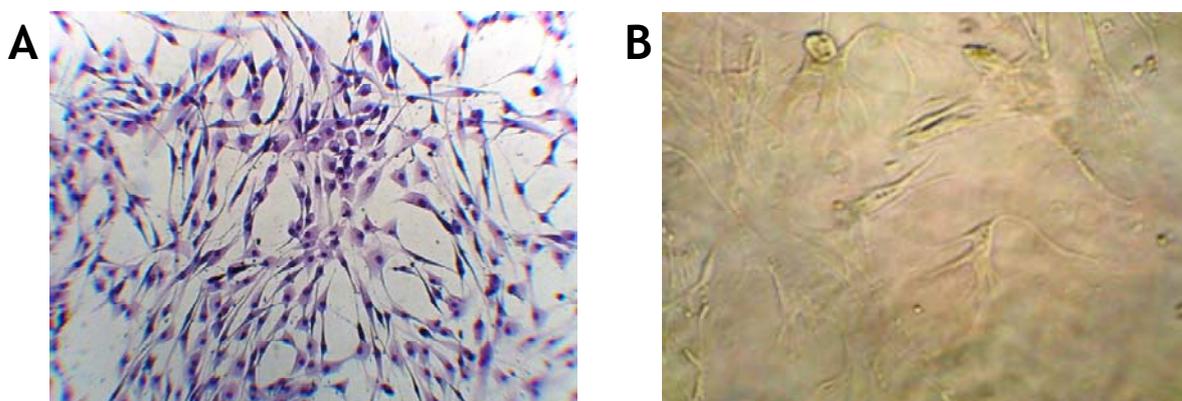


Figure 32 : Tests de différenciation en culture 2D et 3D

Après des tests de différenciation en culture 2D (A) et 3D (B), les cellules présentent une morphologie neurale.

Pour les tests de culture en 2D, les cellules de sphères ont d'abord été mises en co-culture sans sérum sur un tapis de fibroblastes irradiés NIH3T3. Elles ont également été utilisées pour des tests de culture 3D dans du matrigel avec du milieu sans sérum. A l'issue de ces deux types de tests de différenciation, les cellules présentent une morphologie de type neuronale : elles sont allongées avec des processus membranaires ressemblant à des axones et dendrites [Figure 32]. Ces tests de différenciation en culture 2D et 3D confirment le potentiel de

différenciation neurale observé lors de l'analyse de l'expression des gènes neuraux *PAX3* et la *Nestine*.

Nous avons donc voulu déterminer plus exactement quels types de cellules neurales pouvaient être obtenus lors de la différenciation des cellules des sphères. Pour réaliser des tests de différenciation neurale, après dissociation des sphères, les cellules ont été mises en culture sur des lamelles recouvertes de poly-L-Lysine pendant 10 jours avec du milieu DMEM F12 SVF 5 %. A l'issue de ces tests, l'expression des protéines neurales GFAP, O4, et NeuN est analysée par immunofluorescence dans les cellules fixées [Figure 33]. Pour la GFAP, marqueur des astrocytes, O4 (oligodendrocytes) et la protéine nucléolaire NeuN (cellules neurales), les cellules présentent un marquage cytoplasmique pour la GFAP et O4 et nucléaire pour NeuN. Ceci confirme le potentiel de différenciation neurale des cellules des sphères issues du tissu adipeux abdominal.

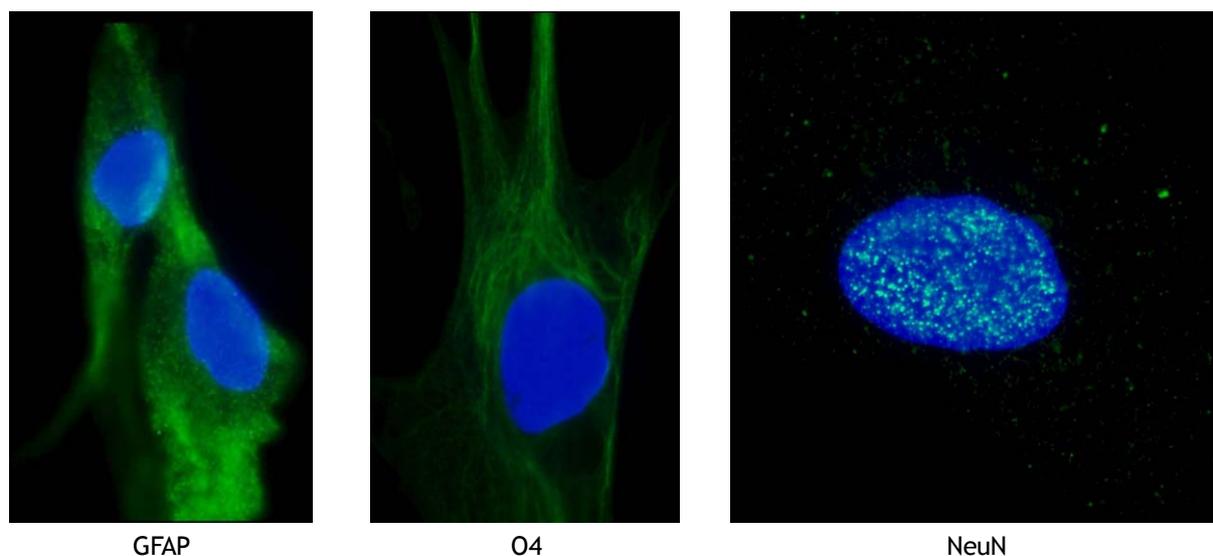


Figure 33 : Immunofluorescence après test de différenciation neurale
Après des tests de différenciation neurale, les cellules ont été marquées par immunofluorescence pour observer les protéines GFAP, NeuN et O4.

A l'issue de ces différents tests de différenciation, nous pouvons conclure que les cellules ADAS pourraient se différencier en cellules neurales dont des cellules de la glie (oligodendrocytes et astrocytes) et des neurones (via l'expression de NeuN).

4. Transfection des cellules ADAS

Afin de développer un modèle de progression tumorale à partir des cellules ADAS contenues dans les sphères, il était essentiel de pouvoir apporter du matériel génétique supplémentaire à savoir nos gènes d'intérêt : *MYC* et *TWIST*. Pour mettre au point la transfection des cellules ADAS, nous avons opté pour l'électroporation. En effet, comme les sphères sont cultivées en suspension et sont délicates à manipuler, l'électroporation est plus pertinente que des transfusions avec des agents tels que la lipofectamine ou le phosphate de calcium.

Les tests d'électroporation ont été réalisés sur l'appareil Multiporator® (Eppendorf®). Pour ces expériences, plusieurs conditions pour chaque paramètre ont été testées afin de déterminer la combinaison optimale pour la transfection d'un plasmide contenant le gène de la GFP :

- 2 électroporations de 400 V pendant 50 μ s et avec un délai de 1 min entre les deux électroporations
- une cuve de 400 μ L de cellules à 1.10^6 cellules/mL dans du tampon hypotonique
- une concentration de 10 μ g/mL pour le plasmide

Après optimisation des conditions d'électroporation, il nous a été possible de transférer les cellules ADAS avec le plasmide GFP et obtenir ainsi des sphères vertes qu'il nous a été possible de maintenir jusqu'à deux passages après la transfection [Figure 34].

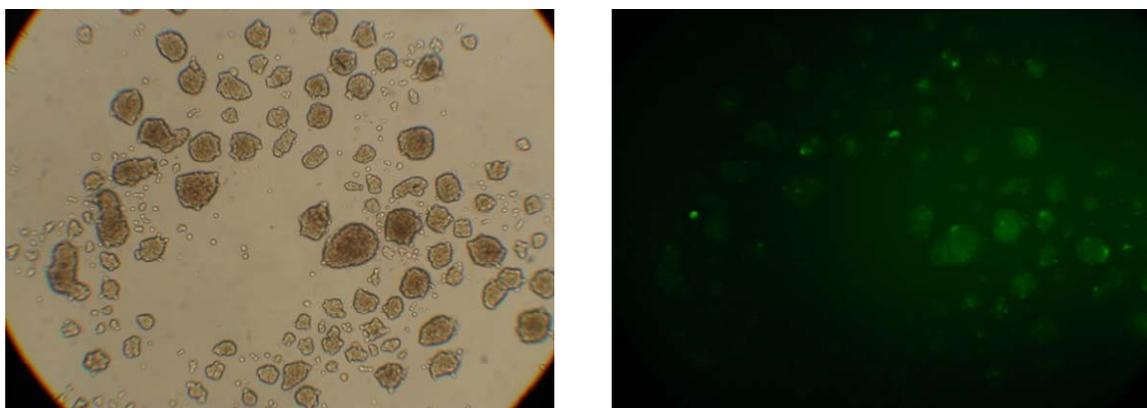


Figure 34 : Sphères transfectées avec la GFP

A gauche, les cellules transfectées avec la GFP observées à la lumière blanche, à droite le même champ sous fluorescence pour visualiser les cellules exprimant la GFP.

L'étape suivante de ce travail est la transfection des gènes *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2*, seuls ou en combinaison *MYC* + *TWIST* pour déterminer s'ils permettent la survie des cellules ADAS au-delà de quelques passages et s'ils leur confèrent des propriétés tumorigéniques.

5. Analyse de la chimiosensibilité des cellules ADAS

L'hypothèse de la cellule souche cancéreuse dit qu'au sein d'une tumeur, il y a quelques cellules dites cellules souches cancéreuses (CSC) ou cellules initiatrices de la tumeur (TIC) qui présentent une chimiorésistance intrinsèque et/ou due à leur isolement. Ces cellules souches cancéreuses seraient également responsables de la rechute par leur capacité de reformer une tumeur après la mort des autres cellules tumorales qui sont sensibles aux drogues.

Comme nous voulions utiliser les cellules ADAS pour établir un modèle de progression tumorale, nous avons testé leur chimiosensibilité à trois drogues, étoposide, cis-platine et vincristine, utilisées en chimiothérapie. Après une incubation de 3h à 37°C avec de l'Uptiblué, la prolifération a été mesurée. Les résultats sont rapportés en taux de multiplicité par rapport au temps T0. Avant passage (P0), et en l'absence de drogues, il a été observé que les cellules des sphères se multiplient 6 fois en 24h [Figure 35A]. Par contre, après l'ajout d'une des drogues, la prolifération stagne sans pour autant diminuer, que ce soit pour des concentrations en drogues à 10^{-7} ou 10^{-4} mol/L. Avec les cellules P0, à 48h et en absence de drogues, nous constatons un arrêt de la prolifération cellulaire [Figure 35B]. En revanche, lors de l'ajout de drogues, celles-ci n'induisent pas la mort des cellules mais une reprise de la prolifération qui passe de 1 à 8, 10 et 12 fois avec respectivement la vincristine, l'étoposide et le cis-platine.

Ces observations indiquent donc que les drogues utilisées, cis-platine, étoposide et vincristine, n'auraient pas d'effet négatif sur la viabilité cellulaire des cellules ADAS à J0. Les cellules ADAS seraient par conséquent intrinsèquement résistantes à ces drogues.

Les mêmes tests avec les sphères après un deuxième passage (P2) induisent les mêmes conséquences à 24 et 48h [Figure 35C et D]. Sans drogues, nous

observons que les cellules ne prolifèrent pas, le nombre de cellule reste à l'équilibre. Après ajout des drogues, la prolifération cellulaire est diminuée aux environs de 0,6 pour les différentes concentrations testées.

Ces résultats suggèrent que les cellules ADAS après deux passages ne proliféreraient plus et qu'elles seraient devenues sensibles au cis-platine, à l'étoposide et à la vincristine.

Ces deux tests de chimiosensibilité sur les cellules ADAS à P0 et P2 mettent en évidence la chimiorésistance intrinsèque des cellules ADAS à P0 mais également le fait que celle-ci serait perdue après deux passages.

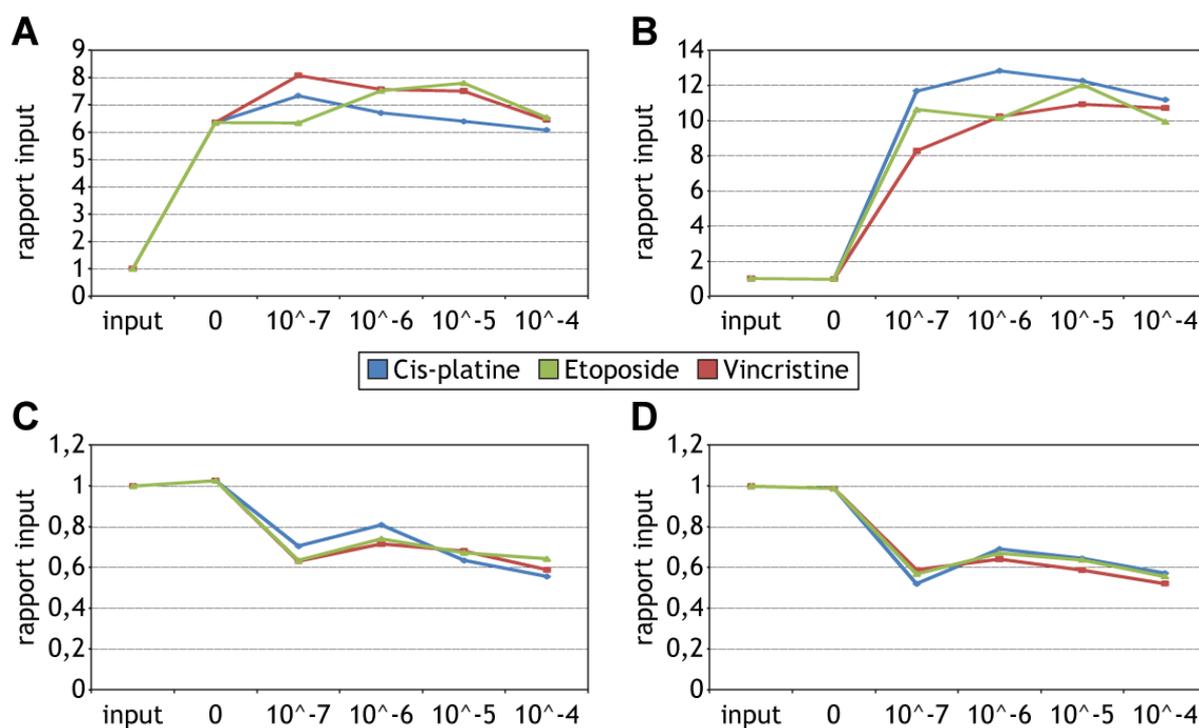


Figure 35 : Tests de sensibilité aux drogues

(A) cellules ADAS P0 à 24h et (B) à 48h. (C) cellules ADAS P2 à 24h et (D) à 48h. Les cellules ADAS ont été traitées pendant 24 ou 48h avec des doses croissantes 10^{-7} à 10^{-4} mol/L d'étoposide, de cisplatine ou de vincristine. Les cellules à P0 (A et B) et P2 (C et D) n'ont pas la même sensibilité aux drogues.

Nous venons de voir que les cellules extraites du tissu adipeux possèderaient les caractéristiques des cellules ADAS décrites dans la littérature que ce soit au niveau phénotypique ou au niveau des propriétés avec notamment un potentiel de différenciation neurale et une chimiorésistance intrinsèque aux drogues. Ces expériences mettent également en avant le fait que ce projet n'est qu'à la phase

initiale et qu'il reste encore à optimiser les conditions de culture pour pouvoir maintenir les cellules pendant plus longtemps. Enfin, il reste également à transférer les oncogènes *MYC* et *TWIST* dans ces cellules et déterminer si elles seront immortalisées et éventuellement tumorigéniques.

DISCUSSION

VI. DISCUSSION

Le neuroblastome est l'un des rares cancers qui ne présente pas de mutation du gène *TP53* (Imamura et al., 1993;Vogan *et al.*, 1993;Komuro et al., 1993;Hosoi *et al.*, 1994;Castresana et al., 1994). Pourtant, l'activation oncogénique de *N-MYC* ne provoque pas l'apoptose des cellules tumorales. L'identification au laboratoire du gène *TWIST1* comme facteur de survie dans le neuroblastome a permis d'avoir de nouvelles perspectives pour ce cancer (Valesia-Wittmann *et al.*, 2004).

Nous avons montré que la surexpression de *TWIST1* dans le neuroblastome est corrélée à celle de *N-MYC* indépendamment du stade et du statut *N-MYC*, et que dans certaines tumeurs l'expression de *TWIST1* serait corrélée à celle de *c-MYC* [Tableau 7 ; Tableau 8]. Il est également apparu que cette corrélation serait spécifique au neuroblastome. En effet, bien que les tumeurs de sein et de colon qui exprimaient les gènes *TWIST1* et/ou *TWIST2*, exprimaient toutes *c-MYC*, nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre l'expression des gènes *TWIST* et *c-MYC*. La spécificité de cette corrélation pourrait être liée aux propriétés de *N-MYC* dans le contexte cellulaire des cellules du neuroblastome et/ou au caractère moins différencié des neuroblastomes dans lesquels les gènes *TWIST* pourraient être moins réprimés que dans des cellules différenciées comme celles du sein ou du colon chez l'adulte. Toutefois, cette corrélation entre *MYC* et *TWIST* pourrait peut-être se retrouver dans des tumeurs embryonnaires telles que les gliomes ou les médulloblastomes. Par exemple, il a été montré que les gènes *c-MYC* et *TWIST1* étaient exprimés dans les gliomes (Hayashi et al., 2001;Elias *et al.*, 2005). Mais aucune étude n'a montré s'il y avait une corrélation d'expression. Démontrer l'existence d'une corrélation d'expression entre les gènes *MYC* et *TWIST* dans d'autres tumeurs que le neuroblastome pourrait permettre l'identification de mécanismes de tumorigenèse communs et ainsi aboutir à des cibles thérapeutiques communes et efficaces dans des cancers différents.

En modulant l'expression des gènes *c-MYC* et *N-MYC*, nous avons montré que les gènes *TWIST* pourraient être des cibles transcriptionnelles des protéines Myc. Mais il apparaît également que *TWIST1* et *TWIST2* ne sont pas induits de la même

façon par les protéines Myc. Au-delà d'un certain seuil, les protéines Myc n'induiraient plus l'expression de *TWIST2* mais seraient capables de l'inhiber. Ces données pourraient expliquer la prévalence de *TWIST1* dans le neuroblastome en comparaison à *TWIST2* qui n'est exprimé que dans quelques lignées et presque pas de tumeurs de neuroblastome.

A l'aide de système reporteur pGL3 luciférase et des expériences de gels retard, nous avons montré que les protéines Myc pourraient se fixer au promoteur du gène *TWIST1* et l'activer. Les résultats obtenus avec les constructions contenant un boîte E mutée suggèrent que cette régulation serait partiellement dépendante des boîtes E. Néanmoins, les partenaires des protéines Myc et par conséquent les mécanismes exacts de cette activation restent à élucider.

Or, comme nous l'avons vu, les protéines Myc pourraient se fixer à l'élément INR du promoteur *TWIST1* et il a été décrit que la protéine Miz1 recrute les complexes Myc-Max au niveau des INR (Li *et al.*, 1994;Peukert *et al.*, 1997). L'étude de la protéine Miz1 et son rôle dans la régulation des gènes *TWIST* permettrait donc d'apporter des éléments supplémentaires pour la compréhension des mécanismes exacts de la régulation des gènes *TWIST* par les protéines Myc.

Ainsi, nos travaux nous permettent de proposer un modèle hypothétique de régulation dans lequel les gènes *TWIST* seraient des cibles directes des gènes *MYC*. Dans ce modèle, les gènes *TWIST* seraient de base régulés négativement et une levée de répression serait nécessaire. Une faible dose de protéines Myc suffirait pour permettre l'activation de *TWIST2* mais pas de *TWIST1* pour lequel il existerait un mécanisme de répression plus puissant. De plus, à faible dose, les protéines Myc pourraient être recrutées par la protéine Miz1 au niveau de l'élément INR du promoteur *TWIST1* réprimant ainsi l'expression du gène.

En revanche, à forte dose, les complexes Myc-Max qui seraient en excès par rapport aux protéines Miz1, seraient capables d'aller se lier aux boîtes E du promoteur *TWIST1* pour induire l'expression du gène. Ce modèle est vraisemblablement plus complexe faisant intervenir tout un ensemble de cofacteurs et corépresseurs impliqués dans un super complexe répresseur.

Bien qu'elles appartiennent à des sous-groupes différents, les familles Myc et Twist sont composées de facteurs de transcription de la superfamille bHLH et sont par conséquent capables de se lier à des boîtes E et de réguler l'expression de gènes cibles. Et les gènes *MYC* et *TWIST* possèdent tous des boîtes E dans leur promoteur. Or, nous avons montré que les gènes *TWIST* pourraient être des cibles transcriptionnelles des gènes *MYC*, et il existe de nombreux cas de boucles de régulations comme par exemple entre les facteurs NF- κ B et Twist (Sosic *et al.*, 2003). Il pourrait donc être envisagé une situation similaire avec une boucle de rétrocontrôle entre les gènes *MYC* et *TWIST*.

Les relations entre les gènes *MYC* et *TWIST* sont encore peu étudiées. Récemment, dans des lymphocytes B, il a été montré que *TWIST1* était capable d'activer l'expression de *TWIST2* (Doreau *et al.*, 2009). De même, il a été montré que *N-MYC* réprime l'expression de *c-MYC* dans les cellules de neuroblastome (Breit and Schwab, 1989).

Lors de nos expériences de modulation de l'expression de *N-MYC*, nous avons observé que l'activation ou la répression de *N-MYC* conduisait respectivement à la répression ou l'activation de *c-MYC*. Par ailleurs l'activation de *N-MYC* induit de façon séquentielle l'expression de *TWIST2* suivi de *TWIST1* puis le maintien de *TWIST1* au dépend de *TWIST2*. Ainsi, non seulement les gènes *TWIST1* et *TWIST2* seraient des cibles transcriptionnelles des gènes *c-MYC* et *N-MYC*, mais il pourrait également y avoir une régulation plus complexe entre ces quatre gènes avec des boucles de rétrocontrôle entre les gènes *TWIST* et *MYC* ainsi qu'entre les gènes *c-MYC* et *N-MYC* d'une part et entre *TWIST1* et *TWIST2* d'autre part.

En étudiant l'expression de *c-MYC* dans les lignées de neuroblastome, il est apparu que *c-MYC* était exprimé dans des tumeurs Simple Copie (5/7) qui sont généralement issues de tumeurs agressives. De plus, nous avons observé, en accord avec la littérature, que l'inhibition de l'expression de *N-MYC* induisait *c-MYC* (Breit and Schwab, 1989). Ces éléments suggèrent que *c-MYC* pourrait dans certaines conditions remplacer *N-MYC* pour le maintien de l'expression des gènes *TWIST* et lors du processus tumoral. Ceci est en accord avec les observations du groupe de M.D. Hogarthy qui a montré que *c-MYC* était surexprimé dans des neuroblastome SC

de mauvais pronostic (Liu et al., 2008). Ainsi, ce mécanisme pourrait expliquer la dérégulation de *TWIST1* dans certaines lignées et tumeurs de neuroblastomes SC.

A partir de ces conclusions, il apparaît que dans le neuroblastome la surexpression du gène *N-MYC*, par amplification (NMA) ou dérégulation (SC), induirait l'expression de *TWIST1*. A l'inverse, dans les neuroblastomes SC agressifs, c'est la dérégulation de *c-MYC*, possible grâce à une inhibition de *N-MYC*, qui induirait l'expression de *TWIST1*.

Au vu du rôle des gènes *MYC* et *TWIST* et de leur coopération dans la tumorigenèse, et de l'absence de modèle précoce de neuroblastome, nous avons entrepris de développer, en collaboration avec le Dr Maguer-Satta, un modèle de développement tumoral à partir de cellules ADAS capables de se différencier en cellules neurales (Safford et al., 2004; Safford et al., 2002).

L'objectif de ce projet était de modéliser les premières étapes de la tumorigenèse du neuroblastome en transfectant *N-MYC* et *TWIST1* dans les cellules ADAS et d'étudier la contribution de ces gènes.

Nous avons montré que le tissu adipeux abdominal contenait des cellules avec des caractéristiques de cellules souches : les cellules ADAS. Nous avons également montré que les cellules ADAS étaient capables de se différencier en cellules neurales, mais, surtout, que le programme de différenciation neurale serait en quelque sorte le programme lancé par défaut lorsque les cellules ADAS ne seraient pas dans des conditions leur permettant de s'auto-renouveler.

Par ailleurs, les étapes préliminaires de transfection de la GFP dans les sphères étant concluantes, il apparaît que les cellules ADAS pourraient être transfectées avec nos gènes d'intérêt.

De manière intéressante, il a été décrit que le maintien de l'expression des *c-MYC* dans des cellules souches embryonnaires leur permettaient de conserver leur potentiel d'auto-renouvellement (Cartwright *et al.*, 2005). De plus, nous avons vu en introduction que le gène *c-MYC*, avec *OCT3/4*, *SOX2* et *KLF4*, fait partie de la combinaisons des 4 gènes capables de dédifférencier un fibroblaste en cellule souche pluripotente (Okita *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007; Wernig *et al.*,

2007;Hanna *et al.*, 2008). Dans les cellules souches mésenchymales (MSC), il a été montré que les gènes *TWIST* augmentaient l'espérance de vie des MSC en favorisant leur croissance et maintenant leur potentiel d'auto-renouvellement (Isenmann *et al.*, 2009). Par conséquent, la surexpression des gènes *MYC* et *TWIST* pourraient maintenir les cellules ADAS à l'état de cellule (i) pluripotente, (ii) immature et (iii) capable d'autorenouvellement. Il serait donc très intéressant de déterminer les conséquences de la surexpression des gènes *MYC* et *TWIST* dans les cellules ADAS et notamment sur les propriétés de cellules souches mais aussi tumorales.

D'autre part, nos résultats suggèrent que les cellules ADAS présenteraient une résistance intrinsèque à trois drogues utilisées en chimiothérapie : la vincristine, l'étoposide et le cisplatine. Plusieurs mécanismes de résistance ont été décrits :

- Activation et/ou surexpression des pompes à efflux de type ABCG2, ou de protéine MDR (Multi Drogue Resistance).
- Altération de l'expression des enzymes de détoxification cellulaires.
- Défaut de mort cellulaire programmée ou apoptose.
- Réparation plus efficace des stress génotoxiques type enzyme de réparation de l'ADN.
- Protection physique dans une niche.

Dans notre cas, la pompe à efflux n'est pas responsable de la résistance car nous n'avons pas observé de surexpression d'ABCG2. De même, il ne s'agit pas non plus d'une protection physique par une niche. Il faudrait donc analyser l'expression de protéines MDR et la machinerie de réparation de l'ADN ou l'apoptose.

La modification des cellules ADAS par transfection d'oncogènes tels que les gènes *MYC* et *TWIST* permettrait de reconstituer les étapes cruciales de la tumorigenèse que sont la résistance à l'apoptose et aux drogues et les capacités migratoires pour le développement des métastases.

Enfin, l'utilisation des cellules ADAS comme base d'un modèle de transformation tumorale représente une opportunité particulièrement intéressante de tester la théorie présentée par Marris et Denny et reprise par Pahlman et ses collaborateurs (Maris and Denny, 2002;Pahlman *et al.*, 2004). Ils ont mis en

évidence qu'en comparaison d'une cellule adulte différenciée, une cellule embryonnaire souche ou progénitrice serait plus sensible aux événements oncogéniques [Figure 36] (Maris and Denny, 2002;Pahlman et al., 2004). Ainsi, les tumeurs embryonnaires nécessiteraient pour se développer de moins de modifications que les tumeurs adultes solides.

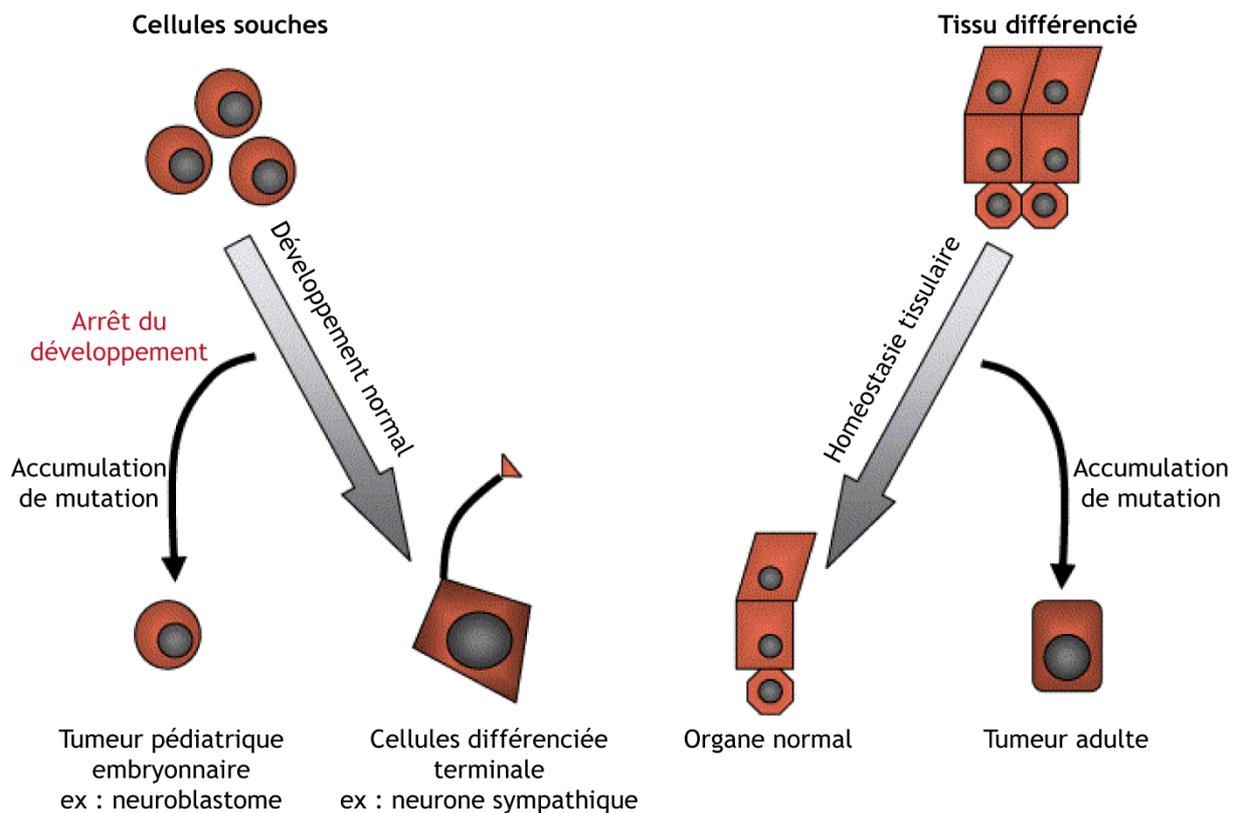


Figure 36 : Transformation tumorale : différences entre tumeurs pédiatriques embryonnaires et tumeurs solides adultes

Figure adaptée de Maris and Denny, 2002;Pahlman et al., 2004.

Les cellules ADAS qui sont des cellules adultes mais avec des propriétés de cellules souches sont par conséquent un modèle pertinent pour étudier les altérations observées dans les cancers pédiatriques et adultes et déterminer leurs conséquences.

**CONCLUSION
&
PERSPECTIVES**

VII. CONCLUSION & PERSPECTIVES

Durant ma thèse, nous avons produit un ensemble de résultats suggérant que les gènes *TWIST* sont des cibles transcriptionnelles des gènes *MYC* et en particulier *TWIST1* et *N-MYC* dans le neuroblastome. Nos résultats nous ont donc permis la découverte d'un nouvel aspect de la coopération oncogénique entre les gènes *MYC* et *TWIST*. Il s'agit aujourd'hui d'approfondir l'étude de la relation entre ces deux familles de gènes pour identifier les différents partenaires intervenant dans la régulation de l'expression des gènes *TWIST* par les gènes *MYC* et leurs fonctions. Il serait notamment intéressant d'étudier le rôle des protéines Miz1 et des cofacteurs modulant l'activité des protéines Myc.

Bien que les mécanismes exacts restent à élucider, la mise en évidence de la régulation des gènes *TWIST* par les protéines Myc présente de nouvelles perspectives quant au traitement du neuroblastome. En effet, ce lien transcriptionnel indique que lors de l'amplification de *N-MYC*, un des mécanismes privilégiés mis en place pour inhiber l'apoptose induite par la dérégulation de *N-MYC* serait l'expression du facteur de survie cellulaire, *TWIST1*. Or, encore aujourd'hui, les neuroblastomes agressifs Simple Copie dérégulés pour *N-MYC* ou *N-MYC* Amplifiés sont toujours incurables. Nous proposons donc l'utilisation du gène *TWIST1* comme cible thérapeutique.

Néanmoins, nous avons vu dans la littérature et dans nos résultats que *TWIST2*, homologue structural de *TWIST1*, présentait également une homologie fonctionnelle avec *TWIST1*. Il nous semble ainsi nécessaire de prendre en compte les deux gènes *TWIST* lors de la conception de drogues anti-Twist.

Bloquer l'expression ou l'activité des gènes *TWIST* pourrait restaurer la sensibilité des cellules tumorales à l'apoptose induite par l'activation oncogénique de *N-MYC* et provoquer une réduction drastique de la croissance tumorale et de la formation de métastases. En effet, il a été décrit que l'expression des gènes *TWIST* était associée à la chimiorésistance et au développement de métastases (Li et al., 2007; Wang et al., 2004; Kwok et al., 2005; Yang et al., 2004; Elias et al., 2005; Shiota et al., 2008; Zhuo et al., 2008; Pham et al., 2007; Luo et al., 2008). Les drogues anti-Twist pourraient être utilisées en complément d'autres thérapies dans le

neuroblastome mais également dans d'autres cancers où la dérégulation des gènes *TWIST* a été identifiée dont l'ostéosarcome, le mélanome, les gliomes, les leucémies lymphoïdes chroniques, le cancer du sein, de l'ovaire, de la prostate et de l'estomac (Entz-Werle et al., 2005;Hoek et al., 2004;Raval et al., 2005;Yang et al., 2004;Kwok et al., 2005;Rosivatz et al., 2002;Hosono et al., 2007;Luo et al., 2008;Elias et al., 2005;Matsuo et al., 2009)

Enfin, lors de notre collaboration avec le groupe du Dr Maguer-Satta, nous avons commencé à mettre en place un protocole d'extraction de cellules stromales dérivées du tissu adipeux adulte (ADAS) et nous avons mis au point la transfection de ces cellules. Ces cellules ont été décrites comme multipotentes. Elle peuvent se différencier en différents tissus : épithélial, hépatique, neural... (Zuk et al., 2001;Safford et al., 2002;Zuk et al., 2002;Kang et al., 2004;Safford et al., 2004;Brzoska et al., 2005;Fraser et al., 2006;Kang et al., 2006;Talens-Visconti et al., 2007).

La poursuite de ce projet pourrait passer par l'utilisation des cellules ADAS modifiées pour le développement de différents modèles tumoraux *in vivo*. Par exemple, après surexpression des gènes *MYC* et *TWIST* (et y compris d'autres gènes), ces cellules pourraient être injectées chez la souris par voie intraveineuse ou sous-cutanée afin d'analyser :

- leur survie dans le sang
- les organes qu'elles seraient susceptibles d'envahir
- la formation des tumeurs
- le « homing » de ces cellules

Les modèles animaux mis en place seraient alors des outils particulièrement intéressants pour le développement et l'évaluation de nouvelles drogues contre ces cellules ADAS modifiées. Ces travaux permettraient la validation et le développement de nouvelles thérapeutiques ciblées.

Ainsi dans notre cas particulier, l'utilisation des cellules ADAS surexprimant les gènes *MYC* et/ou *TWIST* permettrait de valider nos hypothèses et/ou de confirmer nos observations. Notamment, la surexpression des gènes *c-MYC* ou *N-*

VII. CONCLUSION & PERSPECTIVES

MYC seuls dans les cellules ADAS pourrait valider nos conclusions sur la régulation transcriptionnelle des gènes *TWIST* par les facteurs Myc.

Au vu de leurs propriétés et de la simplicité relative d'obtention de prélèvements, les cellules ADAS représentent un outil pertinent et essentiel pour le développement d'un modèle de progression tumorale qui permettrait notamment de tester l'hypothèse des Cellules Souches Cancéreuses dans le cas de tumeurs solides.

MATERIEL & METHODES

VIII. MATERIEL & METHODES

A. Culture Cellulaire

1. Lignées

Les lignées cellulaires IMR32, LAN1, LS, SH-SY-5Y, SK-N-AS, SK-N-SH, SHEP, WAC ont été fournies par l'ATCC (*American Type Culture Collection*). La lignée IGRN91 est un don de l'équipe du Dr Jean Bénard (Institut Gustave Roussy, Paris, France). Les lignées CLB-Ba, CLB-Bac, CLB-Bar, CLB-Bel, CLB-Ber Lud 2, CLB-Bou D, CLB-Br, CLB-Ca, CLB-Es, CLB-Ga, CLB-Ge 1, CLB-Ma 1, CLB-Pe, CLB-Re, CLB-Sed, CLB-Tr, CLB-Vol sont issues de patients traités et/ou diagnostiqués au Centre Léon Bérard. Elles ont été établies par l'équipe de Valérie Combaret.

Les lignées de neuroblastome sont cultivées à 37°C, sous 5 % de CO₂, dans du milieu RPMI 1640 (Gibco®) supplémenté avec 10 % sérum de veau fœtal (SVF), 2 % de L-Glutamine et de la Pénicilline-Streptomycine (10000 U/mL; 10000 µg/mL) (Gibco®). Le milieu de la lignée WAC doit être complémenté en 250 mg/mL de généticine (Gibco®).

La lignée TET21N, sous-clone surexprimant *N-MYC* après l'arrêt d'un traitement à la tétracycline, est un don de la part du Dr Manfred Schwab (German Cancer Research Center, Heidelberg, Allemagne). Elle doit être cultivée sous pression de sélection : 250 mg/mL de généticine (Gibco®) et 200 mg/mL d'hygromycine. Pour les cinétiques d'induction, les TET21N sont traitées avec 1 µg/mL de tétracycline, au bout de 48h, les cellules sont lavées avec du tampon PBS 1X plusieurs fois et incubées pendant 30 min dans milieu frais. Le temps t = 0h correspond à la fin de cette dernière incubation. Durant la cinétique les cellules sont cultivées avec le milieu initial sans tétracycline. Pour les cinétiques de répression, les cellules TET21N subissent un premier traitement avec 1 µg/mL de tétracycline pendant 8h puis sont incubées sur la nuit avec le milieu de culture. Le temps t = 0h de la cinétique de répression est déterminé à la fin des 24h puis les cellules sont traitées avec 1 µg/mL de tétracycline durant le reste de la cinétique.

2. Cellules ADAS

A partir de liposuccions de patients sains du Centre Léon Bérard, avec leur consentement, 40 à 80 mL de tissu adipeux est préservé et récupéré pour la recherche. Le prélèvement est transvasé dans une bouteille en verre stérile qsp 60 à 120 mL de milieu DMEM F12 2 % de BSA. Le tissu est digéré pendant 45 min par de la collagénase (C2674 Sigma-Aldrich®) à 0,4 mg/mL. La digestion est arrêtée par ajout du même volume de DMEM F12 5 % SVF.

Après centrifugation 10 min à 300 g, les lipides, les tissus fibreux et le surnageant sont éliminés et le culot cellulaire est repris dans du milieu DMEM F12 2 % BSA puis filtré [Figure 37]. L'élimination des globules rouges nécessite l'ajout de tampon de lyse commercial (Diaclone) : 1 volume de cellules / 4 volumes de tampon. Au bout de 10 min à température ambiante, la lyse est stoppée par ajout du même volume de DMEM F12 5 % SVF. Les cellules sont ensuite centrifugées 10 min à 300 g et reprises dans du milieu DMEM F12 2 % BSA et filtrées sur une membrane de nylon 100 µm (Falcon®). Après une nouvelle centrifugation, les cellules sont reprises dans du DMEM F12 2 % BSA et comptées. Les cellules peuvent ensuite être ensemencées pour la culture, culotées pour les extractions d'ARN et préparées pour la cytométrie en flux.

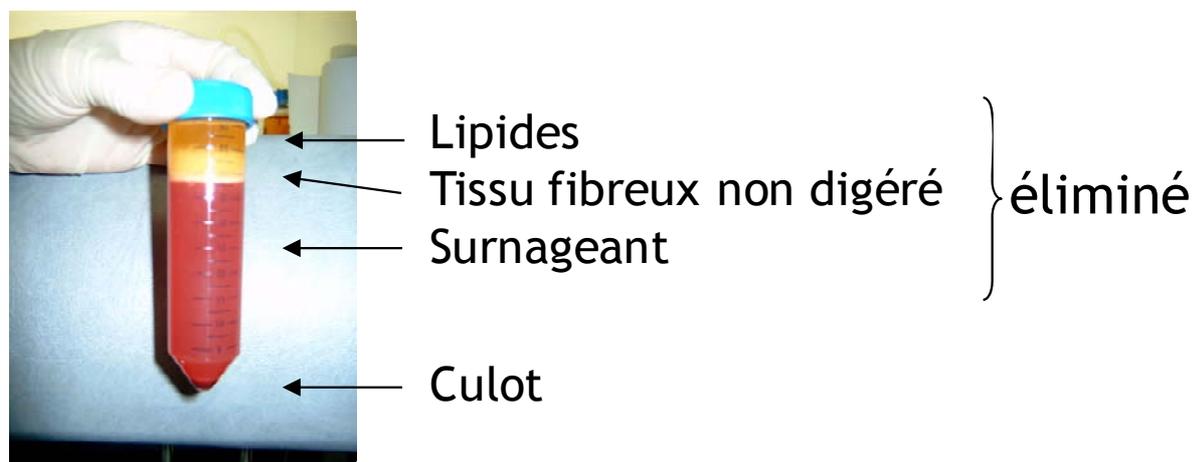


Figure 37 : Extraction de cellules ADAS

Tube issu de la centrifugation après la digestion à la collagénase. Les trois fractions supérieures sont éliminées. Le culot cellulaire contient les cellules ADAS.

Les cellules sont ensemencées à $0,1-0,2 \times 10^6$ cellules/mL et cultivées dans du milieu de base MEBM (Cambrex©) ou DMEM F12 (Gibco®) supplémenté en B27 2 % (Gibco®), *Epidermal Growth Factor* (EGF) à 20 ng/mL (Stem Cell©), basic

Fibroblast Growth Factor (bFGF) à 20 ng/mL (PeproTech®) et de l'héparine à 4 U/mL, dans des flasques, boîtes de Petri ou plaques de culture « *very low attachment* » (Costar®) ou non traitées pour la culture cellulaire (Falcon®).

3. Transfection cellulaire

Pour la transfection des plasmides p34.1-*N-MYC* et pCI-*c-MYC*, dans les lignées de neuroblastome, l'agent de transfection utilisé est l'Exgen 500 (Euromedex®). Les cellules WAC ou SHEP sontensemencées (sans antibiotique pour les cellules WAC) la veille de la transfection à raison de 250000 cellules/puits pour les plaques 6 puits. Les transfactions ont été réalisées selon les recommandations du fabricant avec 1 ou 2 µg de plasmide et 30 µL d'Exgen 500 par puits.

Les siRNA ont été transfectés avec de la Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen™). Les cellules sontensemencées la veille de la transfection selon les mêmes conditions que pour les plasmides pour les plaques 6 puits ou à raison de 2×10^6 cellules/boîte de 10 cm de diamètre. En suivant les recommandations du fabricant, la concentration finale de siRNA utilisée est de 2,4 nmol/mL avec pour un puits de plaque 6 puits 7,5 µL de Lipofectamine™ RNAiMAX dans 500 µL de milieu Optimem (Gibco®) et pour une boîte 10 cm 35 µL de Lipofectamine™ RNAiMAX dans 2 mL de milieu.

Les électroporations des cellules ADAS ont été effectuées avec l'appareil Multiporator® (Eppendorf®). Pour la transfection, les cellules sont soit issues de l'ensemencement initial lors du prélèvement soitensemencées 3-4 jours avant à $0,1-0,2 \times 10^6$ cellules/mL pour permettre aux cellules de former des sphères. Au moment de la transfection, les sphères sont dissociées par digestion enzymatique 5 min à température ambiante avec de la trypsine-EDTA (Gibco®). Les cellules sont centrifugées 5 min à 300 g puis reprises après numération dans une cuve d'électroporation (Eppendorf® ou Invitrogen™) avec du tampon de transfection hypotonique ou isotonique Multiporator *Electroporation Buffer System* (Eppendorf®). Les cellules sont ensuite immédiatement électroporées avec le plasmide pEGFP-C1 (Clontech®). Après électroporation, le contenu de chaque cuve estensemencé et complété avec du milieu de culture des ADAS dans un puits de

plaque 6 puits « *very low attachment* ». Les cellules sont observées quotidiennement au microscope à fluorescence pour détecter l'expression de la GFP.

Les différentes conditions d'électroporation testées sont :

- Concentration cellulaire : 100000 ; 250000 ; 500000 ; 1000000 ; 1500000 et 2000000 de cellules par mL
- Tampon isotonique ou hypotonique
- Concentration de plasmide : 1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 15 ou 20 µg/mL
- Cuve de 200 mL (2 mm d'espacement entre les plaques d'électroporation) ; 400 mL (4 mm) ou 800 mL (8 mm)
- Durée de l'électroporation : 50 ; 100 ; 250 ou 500 µs
- Délai entre les deux électroporation : 1 min

4. Interférence ARN

Pour inhiber l'expression du gène *N-MYC*, les cellules ont été transfectées avec un siRNA *MYCN_Ex2* dirigé contre la séquence CCCGGUCAUCCUCCAGGAC du transcrit de *N-MYC*. Un siRNA *scramble* (AGCGCGCTTTGTAGGATTCG), choisi pour ne cibler aucun gène, a été utilisé comme contrôle négatif. Les séquences des siRNA ont été soumises à une recherche dans les bases de données BLAST pour vérifier leur spécificité. Après, la transfection des cellules (voir précédemment), les cellules sont récoltées et des culots secs sont préparés à 24, 48 ou 72h.

B. Plasmides et Constructions

1. Plasmides pour la culture cellulaire

Pour la surexpression des gènes *c-MYC* et *N-MYC*, deux plasmides ont été utilisés : pmp34.1-N-Myc (offert par le Dr Schwab) et PCI-c-Myc. Ces plasmides, obtenus à partir des plasmides commerciaux PCI-néo et p34.1, contiennent les séquences codantes des gènes *c-MYC* et *N-MYC*.

Le plasmide pODC utilisé pour les tests luciférase comme contrôle contient la séquence promotrice du gène *ODC*.

2. Constructions pGL3

Les constructions pGL3 ont été obtenues par clonage des différents fragments du promoteur dans le plasmide pGL3-enhancer (Promega). Les constructions utilisées sont : « minimum », « 2E-box », « 1E-boxS », « 1E-boxAS », « 1E-boxS mut », « 1E-boxAS mut » (S pour sens et AS pour antisens) [Figure 28]. La boîte E contenues dans les constructions 1E-boxS et 1E-boxAS ont été mutée de CACGTG à CACGGT à l'aide du kit QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) selon les recommandations du fabricant.

C. Extraction ARN & PCR quantitative en temps réel

L'extraction d'ARN total a été réalisée avec une méthode phénol-chloroforme à l'aide du tampon de lyse TRI® Reagent (Sigma-Aldrich) et des tubes PhaseLockGel (Eppendorf©) pour la séparation des phases. Les échantillons sont dosés par spectrophotométrie.

Les ARN sont extraits à partir de culots secs avec du TRI® Reagent (Sigma-Aldrich®) selon les recommandations du fabricant. Pour la transcription inverse, 1µg d'ARN est utilisé avec le kit *cDNA RT synthesis* (Applied Biosystems) en suivant les conditions du fabricant.

Les ADNc des tumeurs de sein et de colon sont issus de la banque d'ARN, ADNc préparée par Benjamin P Bouchet et le Dr Gaël Grelier au laboratoire. Les ADNc des tumeurs de neuroblastome sont issus des collaborations avec le Dr Hogarty (Texas Children Hospital) et le Dr Jean Bénard (Institut Gustave Roussy).

Les réactions de *Real Time*-PCR (RT-PCR) quantitative ont été réalisées avec les kits LightCycler® TaqMan® or FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I master mix dans l'appareil LightCycler® 2.0 System (Roche Applied Science). Les amorces utilisées pour les gènes figurent sur le [Tableau 10]. Les sondes Universal Probe Library correspondant aux couples amorces ont été choisies sur le site de Roche

Applied

Science

(<https://www.roche-applied-science.com/servlet/RCConfigureUser?URL=StoreFramesetView&storeId=10151&catalogId=10151&langId=-1&countryId=fr>).

Gène	Amorce forward	Amorce reverse	Sonde
<i>ACTB</i>	ATTGGCAATGAGCGGTTC	GGATGCCACAGGACTCCAT	#11
<i>ATP6AP1</i>	TGCAGCTCTCTACCTACTTAGATCC	CTGTGAAATCCTCAATGCTCAG	#01
<i>BMI1</i>	GATACTTACGATGCCAGCA	GGACCATTCTTCTCCAGGT	SYBR
<i>CFL1</i>	GTGCCCTCTCCTTTTCGTTT	TTGAACACCTTGATGACACCAT	#05
<i>CPB1</i>	AGCCGTTGGTGTCTTTGC	ACTTCACCAGGGGAGATGG	#20
<i>GAPDH</i>	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC	#60
<i>GUSB</i>	CGCCCTGCCTATCTGTATTC	TCCCCACAGGGAGTGTGTAG	#57
<i>HPRT1</i>	TGACCTTGATTTATTTGCATACC	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	#73
<i>N-MYC</i>	GGAAGATGAAGAGGAAGAAATCG	CTTGGGACGCACAGTGATGGTG	#25
<i>Nanog</i>	CATCCCTGGTGGTAGGAAGA	CCAACATCCTGAACCTCAGC	SYBR
<i>Nestine</i>	AAGCTGAGGGAAGTCTTGGA	CAGGAGAAACAGGGCCTACA	SYBR
<i>ODC</i>	CTGTCGTCTCAGTGTGAAATTCG	CGCCCGTTCCAAAAGGA	#40
<i>OCT4</i>	GTGAAGTGAGGGCTCCCATA	GAAGGATGTGGTCCGAGTGT	SYBR
<i>PAX3</i>	CCACCCACCTATAGCACCAC	TGCTCCAGGTCTTCCTCTTC	SYBR
<i>PGK1</i>	CTGTGGCTTCTGGCATACT	CTTGCTGCTTTCAGGACCA	#42
<i>TUBA1C</i>	CCCCTTCAAGTTCTAGTCATGC	CATTGCCAATCTGGACACC	#58
<i>TWIST1</i>	GGCTCAGCTACGCCTTCTC	CCTTCTCTGGAAACAATGACATCT	#88
<i>TWIST2</i>	CATGTCCGCCTCCACTA	GCATCATTCAGAATCTCCTCCT	#10
<i>UBB</i>	AGGATCCTGGTATCCGCTAAC	TCACATTTTCGATGGTGTCACT	#39

Tableau 10 : Amorces de RT-PCR quantitative

Pour les réactions de RT-PCR quantitative, les ADNc issus de la transcription inverse sont dilués au 1/60 pour les lignées et les échantillons tumoraux de neuroblastome et au ¼ pour les ADAS.

Le mix de réaction est composé de *FastStart DNA polymerase* et son tampon, de déoxynucléoside triphosphate, de MgCl₂ à 180 µM, de 0,25 µM de chaque amorce (et de la sonde spécifique le cas échéant) et de 1,67 µL d'ADNc dilué. Pour les contrôles négatifs, l'ADNc est remplacé par de l'eau. Toutes les réactions sont faites au minimum en duplicate.

Les programmes d'amplification utilisés comprennent 3 étapes pour les réactions TaqMan® et 4 dont trois identiques pour le SYBR :

- Etape 1 : dénaturation et activation de la polymérase à 95°C pendant 10 min
- Etape 2 : 45 cycles : dénaturation à 95°C pendant 5 sec, suivie de l'appariement et l'extension à 60°C pendant 20 sec
- Etape3 : SYBR seulement : courbe de fusion consistant à augmenter la température de 58°C à 95°C par paliers de 0,1°C
- Etape 4 : refroidissement pendant 30 sec à 40°C

Les courbes de fusion ont été utilisées pour vérifier la spécificité de chaque amplification d'échantillon pour un gène donné grâce à la présence d'un seul et unique pic et l'absence de dimères d'amorces.

L'efficacité de chaque PCR a été déterminée, optimisée et validée au niveau de la reproductibilité par la réalisation de courbes standard. De l'ADNc de la lignée mammaire immortalisée HME-1 ou de la lignée de neuroblastome SHEP ou un mix 1/1 des deux (HME-1/SHEP) ont été utilisés en dilution sérielle au dixième de 1/6 à 1/60000 et la pente de la droite obtenue permet de connaître l'efficacité. Par la suite, l'ADNc HME-1 ou SHEP ou HME-1/SHEP dilué au 1/60 sert de calibrateur, c'est-à-dire qu'il est inclut dans toutes les PCR afin de savoir si le « run » s'est déroulé dans les conditions optimales : les valeurs de cycle de sortie Crossing point (Cp) du calibrateur ne doivent pas varier entre les PCR.

Toutes les PCR ont été analysée avec le LightCycler® Software 4.0 (Roche Applied Science) et les Cp obtenus transférés sous Excel (Microsoft®) pour être normalisés suivant la formule suivante :

$$N = E_T^{CpT(C)-CpT(S)} \times \prod (E_R^{CpR(S)-CpR(C)})$$

où N est le ratio normalisé, E l'efficacité, Cp (Crossing point) le nombre de cycle de sortie, T le gène cible, R un gène de référence, C le calibrateur et S l'échantillon mesuré. Les échantillons ont donc été normalisés par la moyenne géométrique du ratio des valeurs de cycle de sortie de deux gènes de référence : *CFL1* et *ACTB* pour les ADAS ; *CPB1* et *HPRT1* pour les lignées de neuroblastome ;

CFL1 et *GAPDH* pour les tumeurs de neuroblastome ; *ATP6AP1* et *UBB* pour les échantillons de cancer du colon et *ACTB* et *CPB1* pour les tumeurs de sein. Ces gènes ont été sélectionnés parmi 12 (*ACTB*, *ATP6AP1*, *CFL1*, *CPB1*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1*, *PGK1*, *TBP*, *TFRC*, *TUBA1C* et *UBB*) pour leur stabilité dans les échantillons à mesurer grâce à l'applet *geNorm* (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>).

D. Tests luciférase

Les cellules de la lignée SHEP ont étéensemencées à 250000 cellules/puits dans des plaques 6 puits la veille de la transfection. Dans chaque puits, elles sont transfectées avec de l'Exgen 500 (Euromedex©), 0,3 µg de plasmide pRL-TK-luc (Promega), 1,7 µg de plasmide p34.1 *N-MYC* ou PCI-*c-MYC* et 2µg de la construction pGL3 à tester. Chaque transfection est faite en duplicate. Au bout de 24h, l'activité luciférase est dosée à l'aide du Dual-luciferase reporter assay system (Promega) dans un luminomètre (Luminoskan Ascent®, Thermo Scientific) selon les instructions du kit. Le ratio luciférase firefly (contrôlée par la séquence promotrice testée) sur luciférase renilla (activité contrôle grâce au plasmide pRL-TK) est calculé pour chaque condition puis rapporté à la condition vecteur pGL3 vide.

E. Gels retard

Les extraits protéiques nucléaires sont obtenus avec le kit Nuclear Extract (Active Motif) pour les lignées SHEP, WAC et IGRN91. Ils sont utilisés pour des réactions de fixation à des sondes biotinylées en 3' ou des sondes non-marquées. Cinq sondes ciblant différentes parties du promoteur ont été utilisées : GCATTGCCAGCTGTTAGGGCC (boite E1), CTCCAGCGCGGTGCACAAAAC (boite E2), ACAGCCACGTGGCCTGCCTGC (boite E3), CCACGCGTCGCCGCTCGAGAG (non consensus) and TAGGCGCTATCAAATTCCTACTCTCTTACAAGCT (INR). Les boîtes E ont la séquence INR sont soulignées.

Les réactions de fixation ont été réalisées avec le kit LightShift Chemiluminescent EMSA (Thermo Scientific) selon les recommandations du fabricant sans ajout des catalyseurs optionnels. Les réactions de compétitions ont été effectuées avec les sondes non marquées.

Pour les expériences de supershift, les extraits protéiques ont été pré-incubés avec 0,5 µg d'anticorps anti N-Myc (#556438, BD Pharmingen™) ou anti c-Myc pendant 20 min à température ambiante. Après l'incubation, les extraits sont utilisés pour les réactions de fixation comme décrit précédemment.

F. Cytométrie en flux

Après numération, 100000 à 500000 cellules sont utilisées par marquage. Les cellules sont lavées au PBS, centrifugées à 1600 t/min pendant 10min. Le culot est repris dans 150 µL de PBS-BSA Azide par condition de marquage. Les cellules sont ensuite déposées dans des plaques 96 puits à fond conique puis centrifugées à 1600 t/min à 4°C pendant 10 min. Le surnageant est éliminé puis les anticorps ajoutés : 1 µL d'Ac par puits. Après 30 min à 2h d'incubation à 4°C à l'obscurité, il faut ajouter 150 µL de PBS-BSA-Azide par puits, centrifuger (1600 t/min, 4°C, 10 min) et éliminer le surnageant. Les cellules sont ensuite reprises dans 300 µL de PBS et sont transvasées dans des tubes pour cytométrie en flux. Le phénotype des cellules ADAS est déterminé par analyse en cytométrie en flux (FACS : Fluorescence Activated Cell Sorter). Les données obtenues sont analysées à l'aide du logiciel CellQuest.

G. Protocoles de différenciation

1. Culture 2D et 3D

Pour les tests en culture 2D et 3D, les sphères de cellules ADAS sont dissociées. Pour les tests 2D, les cellules sontensemencées dans une boîte contenant des fibroblastes NIH3T3 irradiés à confluence. Les cellules sont cultivées dans du milieu de culture de sphères. Au bout de quelques jours, les cellules sont fixées puis colorées au Giemsa pour être observées au microscope. Pour les tests 3D, les cellules sontensemencées dans du Matrigel™ (BD Biosciences). Les cellules sont cultivées dans du milieu de culture de sphères et observées au bout de quelques jours au microscope.

2. Différenciation neurale

Des lamelles de microscope sont recouvertes de poly-L-lysine avec (#1524, Sigma-Aldrich) une solution à 15 µg/mL à 37°C pendant une nuit. Les sphères de cellules ADAS sont dissociées. Les cellules sontensemencées sur ces lamelles. Les cellules sont cultivées pendant 10 jours dans du milieu DMEM F12 5 % SVF. Au bout de 10 jours, les cellules sont immunomarquées.

Les cellules sont d'abord fixées pendant 30 min à 37°C avec une solution de Paraformaldéhyde (PAF) 4 % puis lavées au PBS et perméabilisés avec une solution de PBS 1 % Triton X100 pendant 5 min à température ambiante sous agitation. La saturation des sites non spécifiques est effectuée par une solution de PBS 0,2 % gélatine pendant 5 min à température ambiante sous agitation. Les cellules sont lavées avec du PBS. Les Ac primaires puis secondaires sont ensuite dilués dans du DAD (#50809, Dako) : NeuN 1/100^{ème} (#MAB377, Chemicon), O4 1/100^{ème} (#MAB345, Chemicon), GFAP 1/200^{ème} (#MAB3402Chemicon). Les anticorps sont déposés à raison de 90 µL par lamelle et incubés 1h à température ambiante. Après lavage au PBS, les anticorps secondaires sont dilués. Pour GFAP et NeuN, l'anticorps secondaire est un IgG anti-lapin TRITC (#A11001, Alexa) au 1/500^{ème} et pour O4, l'IgM anti-souris FITC (#115096020, Jackson) au 1/100^{ème}. Les cellules sont incubées pendant 1h à température ambiante avec 90 µL d'anticorps secondaire par lamelle. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS et les lamelles sont montées et lutées avec 3 µL par lamelle d'une solution de DAPI 1 µg/mL (#D9542, Dako) dans du Dako fluorescent mounting medium (#002627, Dako).

H. Test de toxicité

Les cellules sont dissociées etensemencées en plaques de 96 puits à 10000 cellules/puits et cultivées pendant 24h dans du milieu de culture de sphères. Des drogues sont ajoutées au milieu au bout de 24h en dilution sérielle à partir de 10⁻⁴ jusqu'à 10⁻⁷ de la concentration commerciale. Les drogues testées sont les suivantes : le cisplatine 100 mg/100 ml (Merck), la vincristine 2 mg/2 ml (Mayne Pharma France) et l'étoposide 20 mg/ml (Teva classics).

VIII. MATERIEL & METHODES

Puis 10 μ l d'Uptiblué sont ajoutés dans chaque puits. Après une incubation de 3 heures, la fluorescence et la coloration des échantillons contenus dans les plaques sont mesurées à 590 nm (excitation : 530 nm), à l'aide d'un lecteur de microplaques Fluorolite 1000 (Dynex Technologies).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abel, F., Ejeskar, K., Kogner, P., and Martinsson, T. (1999) Gain of chromosome arm 17q is associated with unfavourable prognosis in neuroblastoma, but does not involve mutations in the somatostatin receptor 2(SSTR2) gene at 17q24. *Br.J.Cancer* *81*, 1402-1409.
2. Alaminos, M., Mora, J., Cheung, N.K., Smith, A., Qin, J., Chen, L., and Gerald, W.L. (2003) Genome-wide analysis of gene expression associated with MYCN in human neuroblastoma. *Cancer Res.* *63*, 4538-4546.
3. Alitalo, K., Saksela, K., Winqvist, R., Alitalo, R., Keski-Oja, J., Laiho, M., Ilvonen, M., Knuutila, S., and de la, C.A. (1985) Acute myelogenous leukaemia with c-myc amplification and double minute chromosomes. *Lancet* *2*, 1035-1039.
4. Altura, R.A., Maris, J.M., Li, H., Boyett, J.M., Brodeur, G.M., and Look, A.T. (1997) Novel regions of chromosomal loss in familial neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes.Cancer* *19*, 176-184.
5. Alvarado, C.S., London, W.B., Look, A.T., Brodeur, G.M., Altmiller, D.H., Thorner, P.S., Joshi, V.V., Rowe, S.T., Nash, M.B., Smith, E.I., Castleberry, R.P., and Cohn, S.L. (2000) Natural history and biology of stage A neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group Study. *J.Pediatr.Hematol.Oncol.* *22*, 197-205.
6. Amler, L.C., and Schwab, M. (1989) Amplified N-myc in human neuroblastoma cells is often arranged as clustered tandem repeats of differently recombined DNA. *Mol.Cell Biol.* *9*, 4903-4913.
7. Ando, K., Ohira, M., Ozaki, T., Nakagawa, A., Akazawa, K., Suenaga, Y., Nakamura, Y., Koda, T., Kamijo, T., Murakami, Y., and Nakagawara, A. (2008) Expression of TSLC1, a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is downregulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation. *Int.J.Cancer* *123*, 2087-2094.
8. Annis, M.G., Soucie, E.L., Dlugosz, P.J., Cruz-Aguado, J.A., Penn, L.Z., Leber, B., and Andrews, D.W. (2005) Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *EMBO J.* *24*, 2096-2103.
9. Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.P., Bouchet, B.P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S., Maestro, R., Voeltzel, T., Selmi, A., Valsesia-Wittmann, S., Caron, d.F., and Puisieux, A. (2008) Induction of EMT by Twist Proteins as a Collateral Effect of Tumor-Promoting Inactivation of Premature Senescence. *Cancer Cell* *14*, 79-89.

10. Aoki, Y., Saint-Germain, N., Gyda, M., Magner-Fink, E., Lee, Y.H., Credidio, C., and Saint-Jeannet, J.P. (2003) Sox10 regulates the development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*. *Dev.Biol.* *259*, 19-33.
11. Aoyama, M., Asai, K., Shishikura, T., Kawamoto, T., Miyachi, T., Yokoi, T., Togari, H., Wada, Y., Kato, T., and Nakagawara, A. (2001) Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants. *Cancer Lett.* *164*, 51-60.
12. Axelson, H., Henriksson, M., Wang, Y., Magnusson, K.P., and Klein, G. (1995) The amino-terminal phosphorylation sites of C-MYC are frequently mutated in Burkitt's lymphoma lines but not in mouse plasmacytomas and rat immunocytomas. *Eur.J.Cancer* *31A*, 2099-2104.
13. Ayer, D.E., and Eisenman, R.N. (1993) A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation. *Genes Dev.* *7*, 2110-2119.
14. Bader, S.A., Fasching, C., Brodeur, G.M., and Stanbridge, E.J. (1991) Dissociation of suppression of tumorigenicity and differentiation in vitro effected by transfer of single human chromosomes into human neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ.* *2*, 245-255.
15. Barnes, P.J., and Karin, M. (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N.Engl.J.Med.* *336*, 1066-1071.
16. Barrett, G.L. (2000) The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog.Neurobiol.* *61*, 205-229.
17. Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* *116*, 281-297.
18. Baudino, T.A., McKay, C., Pendeville-Samain, H., Nilsson, J.A., MacLean, K.H., White, E.L., Davis, A.C., Ihle, J.N., and Cleveland, J.L. (2002) c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev.* *16*, 2530-2543.
19. Baylies, M.K., and Bate, M. (1996) twist: a myogenic switch in *Drosophila*. *Science* *272*, 1481-1484.
20. Beck, D., Gross, N., Brognara, C.B., and Perruisseau, G. (1995) Expression of stem cell factor and its receptor by human neuroblastoma cells and tumors. *Blood* *86*, 3132-3138.
21. Beier, R., Burgin, A., Kiermaier, A., Fero, M., Karsunky, H., Saffrich, R., Moroy, T., Ansorge, W., Roberts, J., and Eilers, M. (2000) Induction of cyclin E-cdk2 kinase activity, E2F-dependent transcription and cell growth by Myc are genetically separable events. *EMBO J.* *19*, 5813-5823.

22. Beierle, E.A., Trujillo, A., Nagaram, A., Kurenova, E.V., Finch, R., Ma, X., Vella, J., Cance, W.G., and Golubovskaya, V.M. (2007) N-MYC regulates focal adhesion kinase expression in human neuroblastoma. *J.Biol.Chem.* *282*, 12503-12516.
23. Bellmeyer, A., Krase, J., Lindgren, J., and LaBonne, C. (2003) The protooncogene c-myc is an essential regulator of neural crest formation in xenopus. *Dev.Cell* *4*, 827-839.
24. Bello-Fernandez, C., Packham, G., and Cleveland, J.L. (1993) The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *90*, 7804-7808.
25. Benchimol, S. (2001) p53-dependent pathways of apoptosis. *Cell Death.Differ.* *8*, 1049-1051.
26. Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L., and Weintraub, H. (1990) The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* *61*, 49-59.
27. Berthold, F., Baillot, A., Hero, B., Schurr, P., Nerenz, A., Hunneman, D.H., and Sander, J. (1999) Which cases are found and missed by neuroblastoma screening at 1 year? Results from the 1992 to 1995 study in three Federal States of Germany. *J.Clin.Oncol.* *17*, 1200.
28. Berthold, F., and Hero, B. (2000) Neuroblastoma: current drug therapy recommendations as part of the total treatment approach. *Drugs* *59*, 1261-1277.
29. Bessho, F., Hashizume, K., Nakajo, T., and Kamoshita, S. (1991) Mass screening in Japan increased the detection of infants with neuroblastoma without a decrease in cases in older children. *J.Pediatr.* *119*, 237-241.
30. Bhatia, K., Huppi, K., Spangler, G., Siwarski, D., Iyer, R., and Magrath, I. (1993) Point mutations in the c-Myc transactivation domain are common in Burkitt's lymphoma and mouse plasmacytomas. *Nat.Genet.* *5*, 56-61.
31. Bialek, P., Kern, B., Yang, X., Schrock, M., Sasic, D., Hong, N., Wu, H., Yu, K., Ornitz, D.M., Olson, E.N., Justice, M.J., and Karsenty, G. (2004) A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev.Cell* *6*, 423-435.
32. Biedler, J.L., Helson, L., and Spengler, B.A. (1973a) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* *33*, 2643-2652.
33. Biedler, J.L., Helson, L., and Spengler, B.A. (1973b) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* *33*, 2643-2652.

34. Biemar, F., Zinzen, R., Ronshaugen, M., Sementchenko, V., Manak, J.R., and Levine, M.S. (2005) Spatial regulation of microRNA gene expression in the *Drosophila* embryo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 15907-15911.
 35. Blackwell, T.K., Kretzner, L., Blackwood, E.M., Eisenman, R.N., and Weintraub, H. (1990) Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* 250, 1149-1151.
 36. Blackwood, E.M., and Eisenman, R.N. (1991) Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251, 1211-1217.
 37. Blackwood, E.M., Luscher, B., and Eisenman, R.N. (1992) Myc and Max associate in vivo. *Genes Dev.* 6, 71-80.
 38. Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., and Eilers, M. (1999) Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J.* 18, 5321-5333.
 39. Boulton, J., Wyllie, F.S., Williams, E.D., and Wynford-Thomas, D. (1988) N-myc expression in neoplasia of human thyroid C-cells. *Cancer Res.* 48, 4073-4077.
 40. Bourgeois, P., Bolcato-Bellemin, A.L., Danse, J.M., Bloch-Zupan, A., Yoshida, K., Stoetzel, C., and Perrin-Schmitt, F. (1998) The variable expressivity and incomplete penetrance of the twist-null heterozygous mouse phenotype resemble those of human Saethre-Chotzen syndrome. *Hum.Mol.Genet.* 7, 945-957.
 41. Bourgeois, P., Stoetzel, C., Bolcato-Bellemin, A.L., Mattei, M.G., and Perrin-Schmitt, F. (1996) The human H-twist gene is located at 7p21 and encodes a B-HLH protein that is 96% similar to its murine M-twist counterpart. *Mamm.Genome* 7, 915-917.
 42. Bourhis, J., De Vathaire, F., Wilson, G.D., Hartmann, O., Terrier-Lacombe, M.J., Boccon-Gibod, L., McNally, N.J., Lemerle, J., Riou, G., and Benard, J. (1991) Combined analysis of DNA ploidy index and N-myc genomic content in neuroblastoma. *Cancer Res.* 51, 33-36.
 43. Bouzas-Rodriguez, J., Ruben-Cabrera, J., Delloye-Bourgeois, C., Raquin, R.A., Rousseau, R., Combaret, V., Bénard, J., Tauszig-Delamasure, S., and Mehlen, P. NT-3 autocrine production promotes neuroblastoma cell survival. *J.Clin.Invest.* 2009.
- Ref Type: In Press
44. Bown, N., Cotterill, S., Lastowska, M., O'Neill, S., Pearson, A.D., Plantaz, D., Meddeb, M., Danglot, G., Brinkschmidt, C., Christiansen, H., Laureys, G., Speleman, F., Nicholson, J., Bernheim, A., Betts, D.R., Vandesompele, J., and Van Roy, N. (1999) Gain of chromosome arm 17q

- and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N.Engl.J.Med.* *340*, 1954-1961.
45. Breit, S., and Schwab, M. (1989) Suppression of MYC by high expression of NMYC in human neuroblastoma cells. *J.Neurosci.Res.* *24*, 21-28.
 46. Brinkschmidt, C., Christiansen, H., Terpe, H.J., Simon, R., Boecker, W., Lampert, F., and Stoerkel, S. (1997) Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of neuroblastomas--an important methodological approach in paediatric tumour pathology. *J.Pathol.* *181*, 394-400.
 47. Brodeur, G.M., Hayes, F.A., Green, A.A., Casper, J.T., Wasson, J., Wallach, S., and Seeger, R.C. (1987) Consistent N-myc copy number in simultaneous or consecutive neuroblastoma samples from sixty individual patients. *Cancer Res.* *47*, 4248-4253.
 48. Brodeur, G.M., Maris, J.M., Yamashiro, D.J., Hogarty, M.D., and White, P.S. (1997) Biology and genetics of human neuroblastomas. *J.Pediatr.Hematol.Oncol.* *19*, 93-101.
 49. Brodeur, G.M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N.L., Castel, V., Castelberry, R.P., De Bernardi, B., Evans, A.E., Favrot, M., Hedborg, F., and . (1993) Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J.Clin.Oncol.* *11*, 1466-1477.
 50. Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Barrett, A., Berthold, F., Castleberry, R.P., D'Angio, G., De Bernardi, B., Evans, A.E., Favrot, M., Freeman, A.I., and . (1988) International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J.Clin.Oncol.* *6*, 1874-1881.
 51. Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S.E., Wong, K.Y., and Hammond, D. (1986) Clinical implications of oncogene activation in human neuroblastomas. *Cancer* *58*, 541-545.
 52. Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E., and Bishop, J.M. (1984) Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* *224*, 1121-1124.
 53. Brodeur, G.M., Sekhon, G., and Goldstein, M.N. (1977) Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer* *40*, 2256-2263.
 54. Brooks, C.L., and Gu, W. (2006) p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol.Cell* *21*, 307-315.
 55. Brown, A.M., Riddoch, F.C., Robson, A., Redfern, C.P., and Cheek, T.R. (2005) Mechanistic and functional changes in Ca²⁺ entry after retinoic acid-induced differentiation of neuroblastoma cells. *Biochem.J.* *388*, 941-948.

56. Brzoska, M., Geiger, H., Gauer, S., and Baer, P. (2005) Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* *330*, 142-150.
57. Burgess, R., Cserjesi, P., Ligon, K.L., and Olson, E.N. (1995) Paraxis: a basic helix-loop-helix protein expressed in paraxial mesoderm and developing somites. *Dev.Biol.* *168*, 296-306.
58. Burgess, R., Rawls, A., Brown, D., Bradley, A., and Olson, E.N. (1996) Requirement of the paraxis gene for somite formation and musculoskeletal patterning. *Nature* *384*, 570-573.
59. Caron, H., van Sluis, P., Buschman, R., Pereira do, T.R., Maes, P., Beks, L., de Kraker, J., Voute, P.A., Vergnaud, G., Westerveld, A., Slater, R., and Versteeg, R. (1996a) Allelic loss of the short arm of chromosome 4 in neuroblastoma suggests a novel tumour suppressor gene locus. *Hum.Genet.* *97*, 834-837.
60. Caron, H., van Sluis, P., de Kraker, J., Bokkerink, J., Egeler, M., Laureys, G., Slater, R., Westerveld, A., Voute, P.A., and Versteeg, R. (1996b) Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N.Engl.J.Med.* *334*, 225-230.
61. Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., and Dalton, S. (2005) LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* *132*, 885-896.
62. Casciano, I., Mazzocco, K., Boni, L., Pagnan, G., Banelli, B., Allemanni, G., Ponzoni, M., Tonini, G.P., and Romani, M. (2002) Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death.Differ.* *9*, 246-251.
63. Castresana, J.S., Bello, M.J., Rey, J.A., Nebreda, P., Queizan, A., Garcia-Miguel, P., and Pestana, A. (1994) No TP53 mutations in neuroblastomas detected by PCR-SSCP analysis. *Genes Chromosomes.Cancer* *10*, 136-138.
64. Cawley, S., Bekiranov, S., Ng, H.H., Kapranov, P., Sekinger, E.A., Kampa, D., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Cheng, J., Williams, A.J., Wheeler, R., Wong, B., Drenkow, J., Yamanaka, M., Patel, S., Brubaker, S., Tamma, H., Helt, G., Struhl, K., and Gingeras, T.R. (2004) Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell* *116*, 499-509.
65. Chang, T.C., Yu, D., Lee, Y.S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., Dang, C.V., Thomas-Tikhonenko, A., and Mendell, J.T. (2008) Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat.Genet.* *40*, 43-50.

66. Charron, J., Malynn, B.A., Fisher, P., Stewart, V., Jeannotte, L., Goff, S.P., Robertson, E.J., and Alt, F.W. (1992) Embryonic lethality in mice homozygous for a targeted disruption of the N-myc gene. *Genes Dev.* *6*, 2248-2257.
67. Chen, Z.F., and Behringer, R.R. (1995) twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev.* *9*, 686-699.
68. Cheng, G.Z., Chan, J., Wang, Q., Zhang, W., Sun, C.D., and Wang, L.H. (2007) Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res.* *67*, 1979-1987.
69. Chu, P.W., Cheung, W.M., and Kwong, Y.L. (2003) Differential effects of 9-cis, 13-cis and all-trans retinoic acids on the neuronal differentiation of human neuroblastoma cells. *Neuroreport* *14*, 1935-1939.
70. Ciccarone, V., Spengler, B.A., Meyers, M.B., Biedler, J.L., and Ross, R.A. (1989) Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res.* *49*, 219-225.
71. Cohen, P.S., Chan, J.P., Lipkuns kaya, M., Biedler, J.L., and Seeger, R.C. (1994) Expression of stem cell factor and c-kit in human neuroblastoma. The Children's Cancer Group. *Blood* *84*, 3465-3472.
72. Cohn, S.L., Rademaker, A.W., Salwen, H.R., Franklin, W.A., Gonzales-Crussi, F., Rosen, S.T., and Bauer, K.D. (1990a) Analysis of DNA ploidy and proliferative activity in relation to histology and N-myc amplification in neuroblastoma. *Am.J.Pathol.* *136*, 1043-1052.
73. Cohn, S.L., Salwen, H., Quasney, M.W., Ikegaki, N., Cowan, J.M., Herst, C.V., Kennett, R.H., Rosen, S.T., DiGiuseppe, J.A., and Brodeur, G.M. (1990b) Prolonged N-myc protein half-life in a neuroblastoma cell line lacking N-myc amplification. *Oncogene* *5*, 1821-1827.
74. Combaret, V., Gross, N., Lasset, C., Balmas, K., Bouvier, R., Frappaz, D., Beretta-Brogna, C., Philip, T., Favrot, M.C., and Coll, J.L. (1997) Clinical relevance of TRKA expression on neuroblastoma: comparison with N-MYC amplification and CD44 expression. *Br.J.Cancer* *75*, 1151-1155.
75. Connerney, J., Andreeva, V., Leshem, Y., Muentener, C., Mercado, M.A., and Spicer, D.B. (2006) Twist1 dimer selection regulates cranial suture patterning and fusion. *Dev.Dyn.* *235*, 1345-1357.
76. Cordon-Cardo, C., Tapley, P., Jing, S.Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., Lamballe, F., Kovary, K., Klein, R., Jones, K.R., Reichardt, L.F., and . (1991) The trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Cell* *66*, 173-183.

77. Corvi, R., Savelyeva, L., Breit, S., Wenzel, A., Handgretinger, R., Barak, J., Oren, M., Amler, L., and Schwab, M. (1995) Non-syntenic amplification of MDM2 and MYCN in human neuroblastoma. *Oncogene* *10*, 1081-1086.
78. Courtens, W., Levi, S., Verbelen, F., Verloes, A., and Vamos, E. (1997) Feingold syndrome: report of a new family and review. *Am.J.Med.Genet.* *73*, 55-60.
79. Cowling, V.H., Chandriani, S., Whitfield, M.L., and Cole, M.D. (2006) A conserved Myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, and G2 arrest. *Mol.Cell Biol.* *26*, 4226-4239.
80. Cowling, V.H., and Cole, M.D. (2006) Mechanism of transcriptional activation by the Myc oncoproteins. *Semin.Cancer Biol.* *16*, 242-252.
81. Cross, J.C., Flannery, M.L., Blonar, M.A., Steingrimsson, E., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Rutter, W.J., and Werb, Z. (1995) Hxt encodes a basic helix-loop-helix transcription factor that regulates trophoblast cell development. *Development* *121*, 2513-2523.
82. Cserjesi, P., Brown, D., Ligon, K.L., Lyons, G.E., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., and Olson, E.N. (1995a) Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development* *121*, 1099-1110.
83. Cserjesi, P., Brown, D., Lyons, G.E., and Olson, E.N. (1995b) Expression of the novel basic helix-loop-helix gene eHAND in neural crest derivatives and extraembryonic membranes during mouse development. *Dev.Biol.* *170*, 664-678.
84. Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C., and Croce, C.M. (1982) Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *79*, 7824-7827.
85. Dang, C.V. (1999) c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol.Cell Biol.* *19*, 1-11.
86. Dani, C., Blanchard, J.M., Piechaczyk, M., El Sabouty, S., Marty, L., and Jeanteur, P. (1984) Extreme instability of myc mRNA in normal and transformed human cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *81*, 7046-7050.
87. Davis, A.C., Wims, M., Spotts, G.D., Hann, S.R., and Bradley, A. (1993) A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev.* *7*, 671-682.
88. De Preter, K., Vandesompele, J., Menten, B., Carr, P., Fiegler, H., Edsjo, A., Carter, N.P., Yigit, N., Waelput, W., Van Roy, N., Bader, S., Pahlman, S., and Speleman, F. (2005) Positional and functional mapping of a

- neuroblastoma differentiation gene on chromosome 11. *BMC.Genomics* 6, 97.
89. Delloye-Bourgeois, C., Fitamant, J., Paradisi, A., Cappellen, D., Douc-Rasy, S., Raquin, M.A., Stupack, D., Nakagawara, A., Rousseau, R., Combaret, V., Puisieux, A., Valteau-Couanet, D., Benard, J., Bernet, A., and Mehlen, P. (2009) Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J.Exp.Med.* 206, 833-847.
 90. Dontu, G., Jackson, K.W., McNicholas, E., Kawamura, M.J., Abdallah, W.M., and Wicha, M.S. (2004) Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res.* 6, R605-R615.
 91. Doreau, A., Belot, A., Bastid, J., Riche, B., Trescol-Biemont, M.C., Ranchin, B., Fabien, N., Cochat, P., Pouteil-Noble, C., Trolliet, P., Durieu, I., Tebib, J., Kassai, B., Ansieau, S., Puisieux, A., Eliaou, J.F., and Bonnefoy-Berard, N. (2009) Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat.Immunol.* 10, 778-785.
 92. Douc-Rasy, S., Barrois, M., Echeynne, M., Kaghad, M., Blanc, E., Raguenez, G., Goldschneider, D., Terrier-Lacombe, M.J., Hartmann, O., Moll, U., Caput, D., and Benard, J. (2002) DeltaN-p73alpha accumulates in human neuroblastic tumors. *Am.J.Pathol.* 160, 631-639.
 93. Doz, F., Peter, M., Schleiermacher, G., Vielh, P., Validire, P., Putterman, M., Blanquet, V., Desjardins, L., Dufier, J.L., Zucker, J.M., Mosseri, V., Thomas, G., Magdelenat, H., and Delattre, O. (1996) N-MYC amplification, loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 1 and DNA ploidy in retinoblastoma. *Eur.J.Cancer* 32A, 645-649.
 94. Driman, D., Thorner, P.S., Greenberg, M.L., Chilton-MacNeill, S., and Squire, J. (1994) MYCN gene amplification in rhabdomyosarcoma. *Cancer* 73, 2231-2237.
 95. Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., and Karsenty, G. (1997) *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747-754.
 96. Dumont, E., Ralliere, C., and Rescan, P.Y. (2008) Identification of novel genes including *Dermo-1*, a marker of dermal differentiation, expressed in trout somitic external cells. *J.Exp.Biol.* 211, 1163-1168.
 97. Dupin, E., Calloni, G., Real, C., Goncalves-Trentin, A., and Le Douarin, N.M. (2007) Neural crest progenitors and stem cells. *C.R.Biol.* 330, 521-529.
 98. Eilers, M., Schirm, S., and Bishop, J.M. (1991) The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J.* 10, 133-141.

99. Eischen, C.M., Woo, D., Roussel, M.F., and Cleveland, J.L. (2001) Apoptosis triggered by Myc-induced suppression of Bcl-X(L) or Bcl-2 is bypassed during lymphomagenesis. *Mol.Cell Biol.* *21*, 5063-5070.
100. Ejeskar, K., Aburatani, H., Abrahamsson, J., Kogner, P., and Martinsson, T. (1998) Loss of heterozygosity of 3p markers in neuroblastoma tumours implicate a tumour-suppressor locus distal to the FHIT gene. *Br.J.Cancer* *77*, 1787-1791.
101. Eklof, O., Sandstedt, B., Thonell, S., and Ahstrom, L. (1983) Spontaneous regression of stage IV neuroblastoma. *Acta Paediatr.Scand.* *72*, 473-476.
102. el, G., V, Le Merrer, M., Perrin-Schmitt, F., Lajeunie, E., Benit, P., Renier, D., Bourgeois, P., Bolcato-Bellemin, A.L., Munnich, A., and Bonaventure, J. (1997) Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat.Genet.* *15*, 42-46.
103. Elias, M.C., Tozer, K.R., Silber, J.R., Mikheeva, S., Deng, M., Morrison, R.S., Manning, T.C., Silbergeld, D.L., Glackin, C.A., Reh, T.A., and Rostomily, R.C. (2005) TWIST is expressed in human gliomas and promotes invasion. *Neoplasia.* *7*, 824-837.
104. Entz-Werle, N., Lavaux, T., Metzger, N., Stoetzel, C., Lasthaus, C., Marec, P., Kalifa, C., Brugieres, L., Pacquement, H., Schmitt, C., Tabone, M.D., Gentet, J.C., Lutz, P., Babin, A., Oudet, P., Gaub, M.P., and Perrin-Schmitt, F. (2007) Involvement of MET/TWIST/APC combination or the potential role of ossification factors in pediatric high-grade osteosarcoma oncogenesis. *Neoplasia.* *9*, 678-688.
105. Entz-Werle, N., Stoetzel, C., Berard-Marec, P., Kalifa, C., Brugiere, L., Pacquement, H., Schmitt, C., Tabone, M.D., Gentet, J.C., Quillet, R., Oudet, P., Lutz, P., Babin-Boilletot, A., Gaub, M.P., and Perrin-Schmitt, F. (2005) Frequent genomic abnormalities at TWIST in human pediatric osteosarcomas. *Int.J.Cancer* *117*, 349-355.
106. Erisman, M.D., Rothberg, P.G., Diehl, R.E., Morse, C.C., Spandorfer, J.M., and Astrin, S.M. (1985) Deregulation of c-myc gene expression in human colon carcinoma is not accompanied by amplification or rearrangement of the gene. *Mol.Cell Biol.* *5*, 1969-1976.
107. Erttmann, R., Tafese, T., Berthold, F., Kerbl, R., Mann, J., Parker, L., Schilling, F., Ambros, P., Christiansen, H., Favrot, M., Kabisch, H., Hero, B., and Philip, T. (1998) 10 years' neuroblastoma screening in Europe: preliminary results of a clinical and biological review from the Study Group for Evaluation of Neuroblastoma Screening in Europe (SENSE). *Eur.J.Cancer* *34*, 1391-1397.
108. Escot, C., Simony-Lafontaine, J., Maudelonde, T., Puech, C., Pujol, H., and Rochefort, H. (1993) Potential value of increased MYC but not ERBB2 RNA levels as a marker of high-risk mastopathies. *Oncogene* *8*, 969-974.

109. Escot, C., Theillet, C., Lidereau, R., Spyrtos, F., Champeme, M.H., Gest, J., and Callahan, R. (1986) Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *83*, 4834-4838.
110. Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z., and Hancock, D.C. (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* *69*, 119-128.
111. Evans, A.E., D'Angio, G.J., and Randolph, J. (1971) A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's cancer study group A. *Cancer* *27*, 374-378.
112. Felsher, D.W., and Bishop, J.M. (1999) Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *96*, 3940-3944.
113. Fendrich, V., Waldmann, J., Feldmann, G., Schlosser, K., Konig, A., Ramaswamy, A., Bartsch, D.K., and Karakas, E. (2009) Unique expression pattern of the EMT markers Snail, Twist and E-cadherin in benign and malignant parathyroid neoplasia. *Eur.J.Endocrinol.* *160*, 695-703.
114. Feng, M.Y., Wang, K., Song, H.T., Yu, H.W., Qin, Y., Shi, Q.T., and Geng, J.S. (2009) Metastasis-induction and apoptosis-protection by TWIST in gastric cancer cells. *Clin.Exp.Metastasis*.
115. Fernandez, P.C., Frank, S.R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A., and Amati, B. (2003) Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev.* *17*, 1115-1129.
116. Finley, G.G., Schulz, N.T., Hill, S.A., Geiser, J.R., Pipas, J.M., and Meisler, A.I. (1989) Expression of the myc gene family in different stages of human colorectal cancer. *Oncogene* *4*, 963-971.
117. Fiorillo, A., Migliorati, R., Tamburrini, O., Pellegrini, F., Vecchio, P., Buffolano, W., and De Bernardi, B. (1982) Prolonged survival of a patient with disseminated neuroblastoma. *J.Pediatr.* *101*, 564-566.
118. Fong, C.T., Dracopoli, N.C., White, P.S., Merrill, P.T., Griffith, R.C., Housman, D.E., and Brodeur, G.M. (1989) Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *86*, 3753-3757.
119. Fong, C.T., White, P.S., Peterson, K., Sapienza, C., Cavenee, W.K., Kern, S.E., Vogelstein, B., Cantor, A.B., Look, A.T., and Brodeur, G.M. (1992) Loss of heterozygosity for chromosomes 1 or 14 defines subsets of advanced neuroblastomas. *Cancer Res.* *52*, 1780-1785.
120. Frank, S.R., Parisi, T., Taubert, S., Fernandez, P., Fuchs, M., Chan, H.M., Livingston, D.M., and Amati, B. (2003) MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep.* *4*, 575-580.

121. Fraser, J.K., Wulur, I., Alfonso, Z., and Hedrick, M.H. (2006) Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* *24*, 150-154.
122. Freytag, S.O., Dang, C.V., and Lee, W.M. (1990) Definition of the activities and properties of c-myc required to inhibit cell differentiation. *Cell Growth Differ.* *1*, 339-343.
123. Freytag, S.O., and Geddes, T.J. (1992) Reciprocal regulation of adipogenesis by Myc and C/EBP alpha. *Science* *256*, 379-382.
124. Fuchtbauer, E.M. (1995) Expression of M-twist during postimplantation development of the mouse. *Dev.Dyn.* *204*, 316-322.
125. Gaidano, G., Ballerini, P., Gong, J.Z., Inghirami, G., Neri, A., Newcomb, E.W., Magrath, I.T., Knowles, D.M., and Dalla-Favera, R. (1991) p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *88*, 5413-5417.
126. Gansler, T., Chatten, J., Varello, M., Bunin, G.R., and Atkinson, B. (1986) Flow cytometric DNA analysis of neuroblastoma. Correlation with histology and clinical outcome. *Cancer* *58*, 2453-2458.
127. Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.C., Lee, Y.S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K.I., De Marzo, A.M., Van Eyk, J.E., Mendell, J.T., and Dang, C.V. (2009) c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* *458*, 762-765.
128. Garson, J.A., McIntyre, P.G., and Kemshead, J.T. (1985) N-myc amplification in malignant astrocytoma. *Lancet* *2*, 718-719.
129. Gehring, M., Berthold, F., Edler, L., Schwab, M., and Amler, L.C. (1995) The 1p deletion is not a reliable marker for the prognosis of patients with neuroblastoma. *Cancer Res.* *55*, 5366-5369.
130. Germanguz, I., Lev, D., Waisman, T., Kim, C.H., and Gitelman, I. (2007) Four twist genes in zebrafish, four expression patterns. *Dev.Dyn.* *236*, 2615-2626.
131. Gilbert, F., Feder, M., Balaban, G., Brangman, D., Lurie, D.K., Podolsky, R., Rinaldt, V., Vinikoor, N., and Weisband, J. (1984) Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17. *Cancer Res.* *44*, 5444-5449.
132. Gitelman, I. (1997) Twist protein in mouse embryogenesis. *Dev.Biol.* *189*, 205-214.
133. Gitelman, I. (2007) Evolution of the vertebrate twist family and synfunctionalization: a mechanism for differential gene loss through merging of expression domains. *Mol.Biol.Evol.* *24*, 1912-1925.

134. Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R.N., and White, R.J. (2003) Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* *421*, 290-294.
135. Gong, X.Q., and Li, L. (2002) Dermo-1, a multifunctional basic helix-loop-helix protein, represses MyoD transactivation via the HLH domain, MEF2 interaction, and chromatin deacetylation. *J.Biol.Chem.* *277*, 12310-12317.
136. Grandori, C., Cowley, S.M., James, L.P., and Eisenman, R.N. (2000) The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* *16*, 653-699.
137. Gripp, K.W., Zackai, E.H., and Stolle, C.A. (2000) Mutations in the human TWIST gene. *Hum.Mutat.* *15*, 150-155.
138. Grovas, A., Fremgen, A., Rauck, A., Ruyman, F.B., Hutchinson, C.L., Winchester, D.P., and Menck, H.R. (1997) The National Cancer Data Base report on patterns of childhood cancers in the United States. *Cancer* *80*, 2321-2332.
139. Grover, R., Ross, D.A., Richman, P.I., Robinson, B., and Wilson, G.D. (1996) C-myc oncogene expression in human melanoma and its relationship with tumour antigenicity. *Eur.J.Surg.Oncol.* *22*, 342-346.
140. Guo, C., White, P.S., Weiss, M.J., Hogarty, M.D., Thompson, P.M., Stram, D.O., Gerbing, R., Matthay, K.K., Seeger, R.C., Brodeur, G.M., and Maris, J.M. (1999) Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene* *18*, 4948-4957.
141. Gurney, J.G., Ross, J.A., Wall, D.A., Bleyer, W.A., Severson, R.K., and Robison, L.L. (1997) Infant cancer in the U.S.: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992. *J.Pediatr.Hematol.Oncol.* *19*, 428-432.
142. Haapasalo, A., Koponen, E., Hoppe, E., Wong, G., and Castren, E. (2001) Truncated trkB.T1 is dominant negative inhibitor of trkB.TK+-mediated cell survival. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* *280*, 1352-1358.
143. Hahn, C.K., Ross, K.N., Warrington, I.M., Mazitschek, R., Kanegai, C.M., Wright, R.D., Kung, A.L., Golub, T.R., and Stegmaier, K. (2008) Expression-based screening identifies the combination of histone deacetylase inhibitors and retinoids for neuroblastoma differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *105*, 9751-9756.
144. Hamamori, Y., Sartorelli, V., Ogryzko, V., Puri, P.L., Wu, H.Y., Wang, J.Y., Nakatani, Y., and Kedes, L. (1999) Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell* *96*, 405-413.

145. Hamamori, Y., Wu, H.Y., Sartorelli, V., and Kedes, L. (1997) The basic domain of myogenic basic helix-loop-helix (bHLH) proteins is the novel target for direct inhibition by another bHLH protein, Twist. *Mol.Cell Biol.* *17*, 6563-6573.
146. Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B.W., Beard, C., Wernig, M., Creighton, M.P., Steine, E.J., Cassady, J.P., Foreman, R., Lengner, C.J., Dausman, J.A., and Jaenisch, R. (2008) Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* *133*, 250-264.
147. Hansford, L.M., McKee, A.E., Zhang, L., George, R.E., Gerstle, J.T., Thorner, P.S., Smith, K.M., Look, A.T., Yeger, H., Miller, F.D., Irwin, M.S., Thiele, C.J., and Kaplan, D.R. (2007) Neuroblastoma cells isolated from bone marrow metastases contain a naturally enriched tumor-initiating cell. *Cancer Res.* *67*, 11234-11243.
148. Hasselblatt, M., Mertsch, S., Koos, B., Riesmeier, B., Stegemann, H., Jeibmann, A., Tomm, M., Schmitz, N., Wrede, B., Wolff, J.E., Zheng, W., and Paulus, W. (2009) TWIST-1 is overexpressed in neoplastic choroid plexus epithelial cells and promotes proliferation and invasion. *Cancer Res.* *69*, 2219-2223.
149. Hatton, K.S., Mahon, K., Chin, L., Chiu, F.C., Lee, H.W., Peng, D., Morgenbesser, S.D., Horner, J., and DePinho, R.A. (1996) Expression and activity of L-Myc in normal mouse development. *Mol.Cell Biol.* *16*, 1794-1804.
150. Hay, E.D. (1995) An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat.(Basel)* *154*, 8-20.
151. Hayashi, S., Yamamoto, M., Ueno, Y., Ikeda, K., Ohshima, K., Soma, G., and Fukushima, T. (2001) Expression of nuclear factor-kappa B, tumor necrosis factor receptor type 1, and c-Myc in human astrocytomas. *Neurol.Med.Chir (Tokyo)* *41*, 187-195.
152. He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J., and Hammond, S.M. (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* *435*, 828-833.
153. Hebrok, M., Fuchtbauer, A., and Fuchtbauer, E.M. (1997) Repression of muscle-specific gene activation by the murine Twist protein. *Exp.Cell Res.* *232*, 295-303.
154. Hebrok, M., Wertz, K., and Fuchtbauer, E.M. (1994) M-twist is an inhibitor of muscle differentiation. *Dev.Biol.* *165*, 537-544.
155. Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D.R., Parada, L.F., and Chao, M.V. (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* *350*, 678-683.

156. Herbst, A., Hemann, M.T., Tworowski, K.A., Salghetti, S.E., Lowe, S.W., and Tansey, W.P. (2005) A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO Rep.* *6*, 177-183.
157. Hermeking, H., and Eick, D. (1994) Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* *265*, 2091-2093.
158. Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J.F., Obaya, A.J., O'Connell, B.C., Mateyak, M.K., Tam, W., Kohlhuber, F., Dang, C.V., Sedivy, J.M., Eick, D., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2000) Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *97*, 2229-2234.
159. Hirning, U., Schmid, P., Schulz, W.A., Rettenberger, G., and Hameister, H. (1991) A comparative analysis of N-myc and c-myc expression and cellular proliferation in mouse organogenesis. *Mech.Dev.* *33*, 119-125.
160. Hirschmann-Jax, C., Foster, A.E., Wulf, G.G., Nuchtern, J.G., Jax, T.W., Gobel, U., Goodell, M.A., and Brenner, M.K. (2004) A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *101*, 14228-14233.
161. Hirvonen, H., Makela, T.P., Sandberg, M., Kalimo, H., Vuorio, E., and Alitalo, K. (1990) Expression of the myc proto-oncogenes in developing human fetal brain. *Oncogene* *5*, 1787-1797.
162. Hoek, K., Rimm, D.L., Williams, K.R., Zhao, H., Ariyan, S., Lin, A., Kluger, H.M., Berger, A.J., Cheng, E., Trombetta, E.S., Wu, T., Niinobe, M., Yoshikawa, K., Hannigan, G.E., and Halaban, R. (2004) Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res.* *64*, 5270-5282.
163. Hogarty, M.D. (2003) The requirement for evasion of programmed cell death in neuroblastomas with MYCN amplification. *Cancer Lett.* *197*, 173-179.
164. Hollenberg, S.M., Sternglanz, R., Cheng, P.F., and Weintraub, H. (1995) Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol.Cell Biol.* *15*, 3813-3822.
165. Honore, S.M., Aybar, M.J., and Mayor, R. (2003) Sox10 is required for the early development of the prospective neural crest in *Xenopus* embryos. *Dev.Biol.* *260*, 79-96.
166. Horikawa, T., Yang, J., Kondo, S., Yoshizaki, T., Joab, I., Furukawa, M., and Pagano, J.S. (2007) Twist and epithelial-mesenchymal transition are induced by the EBV oncoprotein latent membrane protein 1 and are associated with metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* *67*, 1970-1978.

167. Hornik, C. (2004) The role of cDermo-1 and cTwist in the avian embryo. *Ann.Anat.* *186*, 291-292.
168. Horvilleur, E., Bauer, M., Goldschneider, D., Mergui, X., de la, M.A., Benard, J., Douc-Rasy, S., and Cappellen, D. (2008) p73alpha isoforms drive opposite transcriptional and post-transcriptional regulation of MYCN expression in neuroblastoma cells. *Nucleic Acids Res.* *36*, 4222-4232.
169. Hosoi, G., Hara, J., Okamura, T., Osugi, Y., Ishihara, S., Fukuzawa, M., Okada, A., Okada, S., and Tawa, A. (1994) Low frequency of the p53 gene mutations in neuroblastoma. *Cancer* *73*, 3087-3093.
170. Hosono, S., Kajiyama, H., Terauchi, M., Shibata, K., Ino, K., Nawa, A., and Kikkawa, F. (2007) Expression of Twist increases the risk for recurrence and for poor survival in epithelial ovarian carcinoma patients. *Br.J.Cancer* *96*, 314-320.
171. Hotz, B., Arndt, M., Dullat, S., Bhargava, S., Buhr, H.J., and Hotz, H.G. (2007) Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin.Cancer Res.* *13*, 4769-4776.
172. Howard, T.D., Paznekas, W.A., Green, E.D., Chiang, L.C., Ma, N., Ortiz de Luna, R.I., Garcia, D.C., Gonzalez-Ramos, M., Kline, A.D., and Jabs, E.W. (1997) Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat.Genet.* *15*, 36-41.
173. Hu, L., Roth, J.M., Brooks, P., Ibrahim, S., and Karpatkin, S. (2008) Twist is required for thrombin-induced tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res.* *68*, 4296-4302.
174. Hurlin, P.J., Queva, C., and Eisenman, R.N. (1997) Mnt, a novel Max-interacting protein is coexpressed with Myc in proliferating cells and mediates repression at Myc binding sites. *Genes Dev.* *11*, 44-58.
175. Imamura, J., Bartram, C.R., Berthold, F., Harms, D., Nakamura, H., and Koeffler, H.P. (1993) Mutation of the p53 gene in neuroblastoma and its relationship with N-myc amplification. *Cancer Res.* *53*, 4053-4058.
176. Ingvarsson, S., Asker, C., Axelson, H., Klein, G., and Sumegi, J. (1988) Structure and expression of B-myc, a new member of the myc gene family. *Mol.Cell Biol.* *8*, 3168-3174.
177. Iritani, B.M., and Eisenman, R.N. (1999) c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *96*, 13180-13185.
178. Isenmann, S., Arthur, A., Zannettino, A.C., Turner, J.L., Shi, S., Glackin, C.A., and Gronthos, S. (2009) TWIST family of basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors Mediate Human Mesenchymal Stromal/Stem Cell Growth and Commitment. *Stem Cells*.

179. Ishii, M., Merrill, A.E., Chan, Y.S., Gitelman, I., Rice, D.P., Sucov, H.M., and Maxson, R.E., Jr. (2003) *Msx2* and *Twist* cooperatively control the development of the neural crest-derived skeletogenic mesenchyme of the murine skull vault. *Development* *130*, 6131-6142.
180. Islam, A., Kageyama, H., Hashizume, K., Kaneko, Y., and Nakagawara, A. (2000) Role of survivin, whose gene is mapped to 17q25, in human neuroblastoma and identification of a novel dominant-negative isoform, survivin-beta/2B. *Med.Pediatr.Oncol.* *35*, 550-553.
181. Jenkins, R.B., Qian, J., Lieber, M.M., and Bostwick, D.G. (1997) Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res.* *57*, 524-531.
182. Jiang, J., Kosman, D., Ip, Y.T., and Levine, M. (1991) The dorsal morphogen gradient regulates the mesoderm determinant twist in early *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* *5*, 1881-1891.
183. Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., and Chao, M. (1986) Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* *47*, 545-554.
184. Jopling, C.L., Spriggs, K.A., Mitchell, S.A., Stoneley, M., and Willis, A.E. (2004) L-Myc protein synthesis is initiated by internal ribosome entry. *RNA.* *10*, 287-298.
185. Jopling, C.L., and Willis, A.E. (2001) N-myc translation is initiated via an internal ribosome entry segment that displays enhanced activity in neuronal cells. *Oncogene* *20*, 2664-2670.
186. Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F., and Caput, D. (1997) Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* *90*, 809-819.
187. Kajiyama, H., Hosono, S., Terauchi, M., Shibata, K., Ino, K., Yamamoto, E., Nomura, S., Nawa, A., and Kikkawa, F. (2006) *Twist* expression predicts poor clinical outcome of patients with clear cell carcinoma of the ovary. *Oncology* *71*, 394-401.
188. Kaneko, Y., Kanda, N., Maseki, N., Sakurai, M., Tsuchida, Y., Takeda, T., Okabe, I., and Sakurai, M. (1987) Different karyotypic patterns in early and advanced stage neuroblastomas. *Cancer Res.* *47*, 311-318.
189. Kang, S.K., Putnam, L.A., Ylostalo, J., Popescu, I.R., Dufour, J., Belousov, A., and Bunnell, B.A. (2004) Neurogenesis of Rhesus adipose stromal cells. *J.Cell Sci.* *117*, 4289-4299.

190. Kang, S.K., Shin, M.J., Jung, J.S., Kim, Y.G., and Kim, C.H. (2006) Autologous adipose tissue-derived stromal cells for treatment of spinal cord injury. *Stem Cells Dev.* *15*, 583-594.
191. Kang, Y., and Massague, J. (2004) Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* *118*, 277-279.
192. Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V., and Parada, L.F. (1991) The *trk* proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* *252*, 554-558.
193. Kim, J.W., Zeller, K.I., Wang, Y., Jegga, A.G., Aronow, B.J., O'Donnell, K.A., and Dang, C.V. (2004) Evaluation of *myc* E-box phylogenetic footprints in glycolytic genes by chromatin immunoprecipitation assays. *Mol. Cell Biol.* *24*, 5923-5936.
194. Klein, R., Jing, S.Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., and Barbacid, M. (1991a) The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* *65*, 189-197.
195. Klein, R., Lamballe, F., Bryant, S., and Barbacid, M. (1992) The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron* *8*, 947-956.
196. Klein, R., Nanduri, V., Jing, S.A., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K.R., Reichardt, L.F., and Barbacid, M. (1991b) The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* *66*, 395-403.
197. Knoepfler, P.S., Cheng, P.F., and Eisenman, R.N. (2002) N-*myc* is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev.* *16*, 2699-2712.
198. Knudson, A.G., Jr., and Strong, L.C. (1972) Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. *Am.J.Hum.Genet.* *24*, 514-532.
199. Kohl, N.E., Gee, C.E., and Alt, F.W. (1984) Activated expression of the N-*myc* gene in human neuroblastomas and related tumors. *Science* *226*, 1335-1337.
200. Kohl, N.E., Kanda, N., Schreck, R.R., Bruns, G., Latt, S.A., Gilbert, F., and Alt, F.W. (1983) Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell* *35*, 359-367.
201. Kojc, N., Zidar, N., Gale, N., Poljak, M., Fujs, K.K., Cardesa, A., Hofler, H., and Becker, K.F. (2009) Transcription factors Snail, Slug, Twist, and SIP1 in spindle cell carcinoma of the head and neck. *Virchows Arch.* *454*, 549-555.

202. Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., and Kishimoto, T. (1997) Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* *89*, 755-764.
203. Komuro, H., Hayashi, Y., Kawamura, M., Hayashi, K., Kaneko, Y., Kamoshita, S., Hanada, R., Yamamoto, K., Hongo, T., Yamada, M., and . (1993) Mutations of the *p53* gene are involved in Ewing's sarcomas but not in neuroblastomas. *Cancer Res.* *53*, 5284-5288.
204. Komuro, H., Saihara, R., Shinya, M., Takita, J., Kaneko, S., Kaneko, M., and Hayashi, Y. (2007) Identification of side population cells (stem-like cell population) in pediatric solid tumor cell lines. *J.Pediatr.Surg.* *42*, 2040-2045.
205. Koralov, S.B., Muljo, S.A., Galler, G.R., Krek, A., Chakraborty, T., Kanellopoulou, C., Jensen, K., Cobb, B.S., Merckenschlager, M., Rajewsky, N., and Rajewsky, K. (2008) Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell* *132*, 860-874.
206. Kushner, B.H., Gilbert, F., and Helson, L. (1986) Familial neuroblastoma. Case reports, literature review, and etiologic considerations. *Cancer* *57*, 1887-1893.
207. Kwok, W.K., Ling, M.T., Lee, T.W., Lau, T.C., Zhou, C., Zhang, X., Chua, C.W., Chan, K.W., Chan, F.L., Glackin, C., Wong, Y.C., and Wang, X. (2005) Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res.* *65*, 5153-5162.
208. Kwok, W.K., Ling, M.T., Yuen, H.F., Wong, Y.C., and Wang, X. (2007) Role of p14ARF in TWIST-mediated senescence in prostate epithelial cells. *Carcinogenesis* *28*, 2467-2475.
209. Kyo, S., Sakaguchi, J., Ohno, S., Mizumoto, Y., Maida, Y., Hashimoto, M., Nakamura, M., Takakura, M., Nakajima, M., Masutomi, K., and Inoue, M. (2006) High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival. *Hum.Pathol.* *37*, 431-438.
210. LaBonne, C., and Bronner-Fraser, M. (1998) Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two-signal model. *Development* *125*, 2403-2414.
211. LaBonne, C., and Bronner-Fraser, M. (2000) Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. *Dev.Biol.* *221*, 195-205.
212. Lamballe, F., Klein, R., and Barbacid, M. (1991) *trkC*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* *66*, 967-979.

213. Land, H., Parada, L.F., and Weinberg, R.A. (1983) Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* *304*, 596-602.
214. Lastowska, M., Roberts, P., Pearson, A.D., Lewis, I., Wolstenholme, J., and Bown, N. (1997) Promiscuous translocations of chromosome arm 17q in human neuroblastomas. *Genes Chromosomes.Cancer* *19*, 143-149.
215. Lavenius, E., Gestblom, C., Johansson, I., Nanberg, E., and Pahlman, S. (1995) Transfection of TRK-A into human neuroblastoma cells restores their ability to differentiate in response to nerve growth factor. *Cell Growth Differ.* *6*, 727-736.
216. Lee, M.S., Lowe, G., Flanagan, S., Kuchler, K., and Glackin, C.A. (2000) Human Dermo-1 has attributes similar to twist in early bone development. *Bone* *27*, 591-602.
217. Lee, M.S., Lowe, G.N., Strong, D.D., Wergedal, J.E., and Glackin, C.A. (1999) TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, can regulate the human osteogenic lineage. *J.Cell Biochem.* *75*, 566-577.
218. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* *75*, 843-854.
219. Lee, T.K., Poon, R.T., Yuen, A.P., Ling, M.T., Kwok, W.K., Wang, X.H., Wong, Y.C., Guan, X.Y., Man, K., Chau, K.L., and Fan, S.T. (2006) Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin.Cancer Res.* *12*, 5369-5376.
220. Lee, W.H., Murphree, A.L., and Benedict, W.F. (1984) Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma. *Nature* *309*, 458-460.
221. Lee, Y.B., Bantounas, I., Lee, D.Y., Phylactou, L., Caldwell, M.A., and Uney, J.B. (2009) Twist-1 regulates the miR-199a/214 cluster during development. *Nucleic Acids Res.* *37*, 123-128.
222. Leptin, M. (1991) twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev.* *5*, 1568-1576.
223. Leptin, M., and Grunewald, B. (1990) Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* *110*, 73-84.
224. Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* *120*, 15-20.

225. Li, J., Wood, W.H., III, Becker, K.G., Weeraratna, A.T., and Morin, P.J. (2007) Gene expression response to cisplatin treatment in drug-sensitive and drug-resistant ovarian cancer cells. *Oncogene* 26, 2860-2872.
226. Li, L., Cserjesi, P., and Olson, E.N. (1995) Dermo-1: a novel twist-related bHLH protein expressed in the developing dermis. *Dev.Biol.* 172, 280-292.
227. Li, L.H., Nerlov, C., Prendergast, G., MacGregor, D., and Ziff, E.B. (1994) c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *EMBO J.* 13, 4070-4079.
228. Lin, C.H., Jackson, A.L., Guo, J., Linsley, P.S., and Eisenman, R.N. (2009) Myc-regulated microRNAs attenuate embryonic stem cell differentiation. *EMBO J.* 28, 3157-3170.
229. Little, C.D., Nau, M.M., Carney, D.N., Gazdar, A.F., and Minna, J.D. (1983) Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 306, 194-196.
230. Liu, X., Mazanek, P., Dam, V., Wang, Q., Zhao, H., Guo, R., Jagannathan, J., Cnaan, A., Maris, J.M., and Hogarty, M.D. (2008) Deregulated Wnt/beta-catenin program in high-risk neuroblastomas without MYCN amplification. *Oncogene* 27, 1478-1488.
231. Look, A.T., Hayes, F.A., Nitschke, R., McWilliams, N.B., and Green, A.A. (1984) Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N.Engl.J.Med.* 311, 231-235.
232. Look, A.T., Hayes, F.A., Shuster, J.J., Douglass, E.C., Castleberry, R.P., Bowman, L.C., Smith, E.I., and Brodeur, G.M. (1991) Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J.Clin.Oncol.* 9, 581-591.
233. Lucarelli, E., Kaplan, D., and Thiele, C.J. (1997) Activation of trk-A but not trk-B signal transduction pathway inhibits growth of neuroblastoma cells. *Eur.J.Cancer* 33, 2068-2070.
234. Luo, G.Q., Li, J.H., Wen, J.F., Zhou, Y.H., Hu, Y.B., and Zhou, J.H. (2008) Effect and mechanism of the Twist gene on invasion and metastasis of gastric carcinoma cells. *World J.Gastroenterol.* 14, 2487-2493.
235. Lutz, W., Stohr, M., Schurmann, J., Wenzel, A., Lohr, A., and Schwab, M. (1996) Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of alpha-prothymosin and ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells. *Oncogene* 13, 803-812.

236. Ma, L., Teruya-Feldstein, J., and Weinberg, R.A. (2007) Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer
1. *Nature* 449, 682-688.
237. Maestro, R., Dei Tos, A.P., Hamamori, Y., Krasnokutsky, S., Sartorelli, V., Kedes, L., Doglioni, C., Beach, D.H., and Hannon, G.J. (1999) Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev.* 13, 2207-2217.
238. Makela, T.P., Saksela, K., and Alitalo, K. (1989) Two N-myc polypeptides with distinct amino termini encoded by the second and third exons of the gene. *Mol.Cell Biol.* 9, 1545-1552.
239. Manhani, R., Cristofani, L.M., Odone, F., V, and Bendit, I. (1997) Concomitant p53 mutation and MYCN amplification in neuroblastoma. *Med.Pediatr.Oncol.* 29, 206-207.
240. Maris, J.M., and Denny, C.T. (2002) Focus on embryonal malignancies. *Cancer Cell* 2, 447-450.
241. Maris, J.M., Guo, C., White, P.S., Hogarty, M.D., Thompson, P.M., Stram, D.O., Gerbing, R., Matthay, K.K., Seeger, R.C., and Brodeur, G.M. (2001) Allelic deletion at chromosome bands 11q14-23 is common in neuroblastoma. *Med.Pediatr.Oncol.* 36, 24-27.
242. Maris, J.M., and Matthay, K.K. (1999) Molecular biology of neuroblastoma. *J.Clin.Oncol.* 17, 2264-2279.
243. Maris, J.M., White, P.S., Beltinger, C.P., Sulman, E.P., Castleberry, R.P., Shuster, J.J., Look, A.T., and Brodeur, G.M. (1995) Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma. *Cancer Res.* 55, 4664-4669.
244. Martin, T.A., Goyal, A., Watkins, G., and Jiang, W.G. (2005) Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann.Surg.Oncol.* 12, 488-496.
245. Martin-Zanca, D., Hughes, S.H., and Barbacid, M. (1986) A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 319, 743-748.
246. Martinsen, B.J., and Bronner-Fraser, M. (1998) Neural crest specification regulated by the helix-loop-helix repressor Id2. *Science* 281, 988-991.
247. Martinsson, T., Sjoberg, R.M., Hedborg, F., and Kogner, P. (1995) Deletion of chromosome 1p loci and microsatellite instability in neuroblastomas analyzed with short-tandem repeat polymorphisms. *Cancer Res.* 55, 5681-5686.
248. Mateyak, M.K., Obaya, A.J., Adachi, S., and Sedivy, J.M. (1997) Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ.* 8, 1039-1048.

249. Mathieu, P., Frappaz, D., Chauvin, F., Combaret, V., Vercherat, M., Brunat-Mentigny, M., David, L., Esteve, J., Favrot, M., Fouillat, V., Greffe, J., Lasset, C., Renaud, P., and Philip, T. (1996) A 5-year (1990-1994) neuroblastoma screening feasibility study in France. *Methodology and preliminary observations. Early Hum.Dev.* *46*, 177-196.
250. Matsuo, N., Shiraha, H., Fujikawa, T., Takaoka, N., Ueda, N., Tanaka, S., Nishina, S., Nakanishi, Y., Uemura, M., Takaki, A., Nakamura, S., Kobayashi, Y., Nouse, K., Yagi, T., and Yamamoto, K. (2009) Twist expression promotes migration and invasion in hepatocellular carcinoma. *BMC.Cancer* *9*, 240.
251. Matthay, K.K. (1995) Neuroblastoma: a clinical challenge and biologic puzzle. *CA Cancer J.Clin.* *45*, 179-192.
252. Matthay, K.K., Villablanca, J.G., Seeger, R.C., Stram, D.O., Harris, R.E., Ramsay, N.K., Swift, P., Shimada, H., Black, C.T., Brodeur, G.M., Gerbing, R.B., and Reynolds, C.P. (1999) Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *Children's Cancer Group. N.Engl.J.Med.* *341*, 1165-1173.
253. McMahon, S.B., Wood, M.A., and Cole, M.D. (2000) The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol.Cell Biol.* *20*, 556-562.
254. Meddeb, M., Danglot, G., Chudoba, I., Venuat, A.M., Benard, J., Avet-Loiseau, H., Vasseur, B., Le Paslier, D., Terrier-Lacombe, M.J., Hartmann, O., and Bernheim, A. (1996) Additional copies of a 25 Mb chromosomal region originating from 17q23.1-17qter are present in 90% of high-grade neuroblastomas. *Genes Chromosomes.Cancer* *17*, 156-165.
255. Meltzer, S.J., O'Doherty, S.P., Frantz, C.N., Smolinski, K., Yin, J., Cantor, A.B., Liu, J., Valentine, M., Brodeur, G.M., and Berg, P.E. (1996) Allelic imbalance on chromosome 5q predicts long-term survival in neuroblastoma. *Br.J.Cancer* *74*, 1855-1861.
256. Mendell, J.T. (2005) MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. *Cell Cycle* *4*, 1179-1184.
257. Mertens, F., Johansson, B., Hoglund, M., and Mitelman, F. (1997) Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res.* *57*, 2765-2780.
258. Meulemans, D., and Bronner-Fraser, M. (2004) Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev.Cell* *7*, 291-299.
259. Meulemans, D., McCauley, D., and Bronner-Fraser, M. (2003) Id expression in amphioxus and lamprey highlights the role of gene cooption during neural crest evolution. *Dev.Biol.* *264*, 430-442.

260. Meyer, N., and Penn, L.Z. (2008) Reflecting on 25 years with MYC. *Nat.Rev.Cancer* *8*, 976-990.
261. Michels, E., Hoebeeck, J., De Preter, K., Schramm, A., Brichard, B., De Paepe, A., Eggert, A., Laureys, G., Vandesompele, J., and Speleman, F. (2008) CADM1 is a strong neuroblastoma candidate gene that maps within a 3.72 Mb critical region of loss on 11q23. *BMC.Cancer* *8*, 173.
262. Mironchik, Y., Winnard, P.T., Jr., Vesuna, F., Kato, Y., Wildes, F., Pathak, A.P., Kominsky, S., Artemov, D., Bhujwala, Z., Van Diest, P., Burger, H., Glackin, C., and Raman, V. (2005) Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Res.* *65*, 10801-10809.
263. Mizukami, Y., Nonomura, A., Takizawa, T., Noguchi, M., Michigishi, T., Nakamura, S., and Ishizaki, T. (1995) N-myc protein expression in human breast carcinoma: prognostic implications. *Anticancer Res.* *15*, 2899-2905.
264. Moens, C.B., Auerbach, A.B., Conlon, R.A., Joyner, A.L., and Rossant, J. (1992) A targeted mutation reveals a role for N-myc in branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Genes Dev.* *6*, 691-704.
265. Moll, U.M., LaQuaglia, M., Benard, J., and Riou, G. (1995) Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *92*, 4407-4411.
266. Morgenbesser, S.D., Schreiber-Agus, N., Bidder, M., Mahon, K.A., Overbeek, P.A., Horner, J., and DePinho, R.A. (1995) Contrasting roles for c-Myc and L-Myc in the regulation of cellular growth and differentiation in vivo. *EMBO J.* *14*, 743-756.
267. Morrow, M.A., Lee, G., Gillis, S., Yancopoulos, G.D., and Alt, F.W. (1992) Interleukin-7 induces N-myc and c-myc expression in normal precursor B lymphocytes. *Genes Dev.* *6*, 61-70.
268. Mugrauer, G., Alt, F.W., and Ekblom, P. (1988) N-myc proto-oncogene expression during organogenesis in the developing mouse as revealed by in situ hybridization. *J.Cell Biol.* *107*, 1325-1335.
269. Murphy, D.M., Buckley, P.G., Bryan, K., Das, S., Alcock, L., Foley, N.H., Prenter, S., Bray, I., Watters, K.M., Higgins, D., and Stallings, R.L. (2009) Global MYCN transcription factor binding analysis in neuroblastoma reveals association with distinct E-box motifs and regions of DNA hypermethylation. *PLoS.One.* *4*, e8154.
270. Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., and . (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate

- complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.
271. Nair, S.K., and Burley, S.K. (2003) X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell* 112, 193-205.
272. Nakagawa, T., Takahashi, M., Ozaki, T., Watanabe, K., Hayashi, S., Hosoda, M., Todo, S., and Nakagawara, A. (2003) Negative autoregulation of p73 and p53 by DeltaNp73 in regulating differentiation and survival of human neuroblastoma cells. *Cancer Lett.* 197, 105-109.
273. Nakagawara, A., Arima, M., Azar, C.G., Scavarda, N.J., and Brodeur, G.M. (1992) Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. *Cancer Res.* 52, 1364-1368.
274. Nakagawara, A., Arima-Nakagawara, M., Scavarda, N.J., Azar, C.G., Cantor, A.B., and Brodeur, G.M. (1993) Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N.Engl.J.Med.* 328, 847-854.
275. Nakagawara, A., Azar, C.G., Scavarda, N.J., and Brodeur, G.M. (1994) Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol.Cell Biol.* 14, 759-767.
276. Nakagawara, A., Ikeda, K., Tsuda, T., and Higashi, K. (1988) Biological characteristics of N-myc amplified neuroblastoma in patients over one year of age. *Prog.Clin.Biol.Res.* 271, 31-39.
277. Nau, M.M., Brooks, B.J., Battey, J., Sausville, E., Gazdar, A.F., Kirsch, I.R., McBride, O.W., Bertness, V., Hollis, G.F., and Minna, J.D. (1985) L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature* 318, 69-73.
278. Nau, M.M., Brooks, B.J., Jr., Carney, D.N., Gazdar, A.F., Battey, J.F., Sausville, E.A., and Minna, J.D. (1986) Human small-cell lung cancers show amplification and expression of the N-myc gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83, 1092-1096.
279. Neel, B.G., Jhanwar, S.C., Chaganti, R.S., and Hayward, W.S. (1982) Two human c-onc genes are located on the long arm of chromosome 8. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 79, 7842-7846.
280. Nesbit, C.E., Tersak, J.M., and Prochownik, E.V. (1999) MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18, 3004-3016.
281. Nikolaev, A.Y., Li, M., Puskas, N., Qin, J., and Gu, W. (2003) Parc: a cytoplasmic anchor for p53. *Cell* 112, 29-40.
282. Niu, R.F., Zhang, L., Xi, G.M., Wei, X.Y., Yang, Y., Shi, Y.R., and Hao, X.S. (2007) Up-regulation of Twist induces angiogenesis and correlates

- with metastasis in hepatocellular carcinoma. *J.Exp.Clin.Cancer Res.* *26*, 385-394.
283. Norton, J.D., and Atherton, G.T. (1998) Coupling of cell growth control and apoptosis functions of Id proteins. *Mol.Cell Biol.* *18*, 2371-2381.
284. O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Mendell, J.T. (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* *435*, 839-843.
285. O'Rourke, M.P., Soo, K., Behringer, R.R., Hui, C.C., and Tam, P.P. (2002) Twist plays an essential role in FGF and SHH signal transduction during mouse limb development. *Dev.Biol.* *248*, 143-156.
286. Oberthuer, A., Berthold, F., Warnat, P., Hero, B., Kahlert, Y., Spitz, R., Ernestus, K., Konig, R., Haas, S., Eils, R., Schwab, M., Brors, B., Westermann, F., and Fischer, M. (2006) Customized oligonucleotide microarray gene expression-based classification of neuroblastoma patients outperforms current clinical risk stratification. *J.Clin.Oncol.* *24*, 5070-5078.
287. Ohuchida, K., Mizumoto, K., Ohhashi, S., Yamaguchi, H., Konomi, H., Nagai, E., Yamaguchi, K., Tsuneyoshi, M., and Tanaka, M. (2007) Twist, a novel oncogene, is upregulated in pancreatic cancer: clinical implication of Twist expression in pancreatic juice. *Int.J.Cancer* *120*, 1634-1640.
288. Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* *448*, 313-317.
289. Oppedal, B.R., Oien, O., Jahnsen, T., and Brandtzaeg, P. (1989) N-myc amplification in neuroblastomas: histopathological, DNA ploidy, and clinical variables. *J.Clin.Pathol.* *42*, 1148-1152.
290. Otto, F., Thornell, A.P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K.C., Rosewell, I.R., Stamp, G.W., Beddington, R.S., Mundlos, S., Olsen, B.R., Selby, P.B., and Owen, M.J. (1997) Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* *89*, 765-771.
291. Ou, D.L., Chien, H.F., Chen, C.L., Lin, T.C., and Lin, L.I. (2008) Role of Twist in head and neck carcinoma with lymph node metastasis. *Anticancer Res.* *28*, 1355-1359.
292. Pahlman, S., Stockhausen, M.T., Fredlund, E., and Axelson, H. (2004) Notch signaling in neuroblastoma. *Semin.Cancer Biol.* *14*, 365-373.
293. Pajer, P., Pecenka, V., Karafiat, V., Kralova, J., Horejsi, Z., and Dvorak, M. (2003) The twist gene is a common target of retroviral integration and transcriptional deregulation in experimental nephroblastoma. *Oncogene* *22*, 665-673.

294. Pardal, R., Clarke, M.F., and Morrison, S.J. (2003) Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat.Rev.Cancer* 3, 895-902.
295. Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G.I. (2002) Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell* 109, 321-334.
296. Perez, C.A., Matthay, K.K., Atkinson, J.B., Seeger, R.C., Shimada, H., Haase, G.M., Stram, D.O., Gerbing, R.B., and Lukens, J.N. (2000) Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy: a children's cancer group study. *J.Clin.Oncol.* 18, 18-26.
297. Perrin-Schmitt, F., Bolcato-Bellemin, A.L., Bourgeois, P., Stoetzel, C., and Danse, J.M. (1997) The locations of the H-twist and H-dermo-1 genes are distinct on the human genome. *Biochim.Biophys.Acta* 1360, 1-2.
298. Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hanel, F., and Eilers, M. (1997) An alternative pathway for gene regulation by Myc. *EMBO J.* 16, 5672-5686.
299. Pham, C.G., Bubici, C., Zazzeroni, F., Knabb, J.R., Papa, S., Kuntzen, C., and Franzoso, G. (2007) Upregulation of Twist-1 by NF-kappaB blocks cytotoxicity induced by chemotherapeutic drugs. *Mol.Cell Biol.* 27, 3920-3935.
300. Philip, T. (1999) Early detection of neuroblastoma in infants: Research? Yes. Routine Screening? No. *Med.Pediatr.Oncol.* 33, 355-356.
301. Pietenpol, J.A., Holt, J.T., Stein, R.W., and Moses, H.L. (1990) Transforming growth factor beta 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87, 3758-3762.
302. Pinion, S.B., Kennedy, J.H., Miller, R.W., and MacLean, A.B. (1991) Oncogene expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer of cervix. *Lancet* 337, 819-820.
303. Plantaz, D., Mohapatra, G., Matthay, K.K., Pellarin, M., Seeger, R.C., and Feuerstein, B.G. (1997) Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *Am.J.Pathol.* 150, 81-89.
304. Prescott, T., Devriendt, K., Hamel, B., Pasch, M.C., Peeters, H., Vander, P., V, and Talleras, O. (2006) Focal preauricular dermal dysplasia: distinctive congenital lesions with a bilateral and symmetric distribution. *Eur.J.Med.Genet.* 49, 135-139.
305. Pritchard, J., and Hickman, J.A. (1994) Why does stage 4s neuroblastoma regress spontaneously? *Lancet* 344, 869-870.

306. Rabizadeh, S., Oh, J., Zhong, L.T., Yang, J., Bitler, C.M., Butcher, L.L., and Bredesen, D.E. (1993) Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* *261*, 345-348.
307. Raffioni, S., Bradshaw, R.A., and Buxser, S.E. (1993) The receptors for nerve growth factor and other neurotrophins. *Annu.Rev.Biochem.* *62*, 823-850.
308. Raible, D.W. (2006) Development of the neural crest: achieving specificity in regulatory pathways. *Curr.Opin.Cell Biol.* *18*, 698-703.
309. Ramsay, G., Evan, G.I., and Bishop, J.M. (1984) The protein encoded by the human proto-oncogene c-myc. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *81*, 7742-7746.
310. Raval, A., Lucas, D.M., Matkovic, J.J., Bennett, K.L., Liyanarachchi, S., Young, D.C., Rassenti, L., Kipps, T.J., Grever, M.R., Byrd, J.C., and Plass, C. (2005) TWIST2 demonstrates differential methylation in immunoglobulin variable heavy chain mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia. *J.Clin.Oncol.* *23*, 3877-3885.
311. Reale, M.A., Reyes-Mugica, M., Pierceall, W.E., Rubinstein, M.C., Hedrick, L., Cohn, S.L., Nakagawara, A., Brodeur, G.M., and Fearon, E.R. (1996) Loss of DCC expression in neuroblastoma is associated with disease dissemination. *Clin.Cancer Res.* *2*, 1097-1102.
312. Reisman, D., Elkind, N.B., Roy, B., Beamon, J., and Rotter, V. (1993) c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif. *Cell Growth Differ.* *4*, 57-65.
313. Reiter, J.L., and Brodeur, G.M. (1996) High-resolution mapping of a 130-kb core region of the MYCN amplicon in neuroblastomas. *Genomics* *32*, 97-103.
314. Resar, L.M., Dolde, C., Barrett, J.F., and Dang, C.V. (1993) B-myc inhibits neoplastic transformation and transcriptional activation by c-myc. *Mol.Cell Biol.* *13*, 1130-1136.
315. Ribatti, D., Alessandri, G., Baronio, M., Raffaghello, L., Cosimo, E., Marimpietri, D., Montaldo, P.G., De Falco, G., Caruso, A., Vacca, A., and Ponzoni, M. (2001) Inhibition of neuroblastoma-induced angiogenesis by fenretinide. *Int.J.Cancer* *94*, 314-321.
316. Rice, D.P., Aberg, T., Chan, Y., Tang, Z., Kettunen, P.J., Pakarinen, L., Maxson, R.E., and Thesleff, I. (2000) Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development. *Development* *127*, 1845-1855.
317. Romani, M., Tonini, G.P., Banelli, B., Allemanni, G., Mazzocco, K., Scaruffi, P., Boni, L., Ponzoni, M., Pagnan, G., Raffaghello, L., Ferrini, S., Croce, M., and Casciano, I. (2003) Biological and clinical role of p73 in neuroblastoma. *Cancer Lett.* *197*, 111-117.

318. Rose, C.S., and Malcolm, S. (1997) A TWIST in development. *Trends Genet.* *13*, 384-387.
319. Rosivatz, E., Becker, I., Specht, K., Fricke, E., Lubert, B., Busch, R., Hofler, H., and Becker, K.F. (2002) Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am.J.Pathol.* *161*, 1881-1891.
320. Ross, R.A., Biedler, J.L., and Spengler, B.A. (2003) A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer Lett.* *197*, 35-39.
321. Ross, R.A., and Spengler, B.A. (2007) Human neuroblastoma stem cells. *Semin.Cancer Biol.* *17*, 241-247.
322. Ross, R.A., Spengler, B.A., and Biedler, J.L. (1983) Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J.Natl.Cancer Inst.* *71*, 741-747.
323. Ross, R.A., Spengler, B.A., Domenech, C., Porubcin, M., Rettig, W.J., and Biedler, J.L. (1995) Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells. *Cell Growth Differ.* *6*, 449-456.
324. Roussel, M.F., Cleveland, J.L., Shurtleff, S.A., and Sherr, C.J. (1991) Myc rescue of a mutant CSF-1 receptor impaired in mitogenic signalling. *Nature* *353*, 361-363.
325. Rubie, H., Delattre, O., Hartmann, O., Combaret, V., Michon, J., Benard, J., Peyroulet, M.C., Plantaz, D., Coze, C., Chastagner, P., Baranzelli, M.C., Frappaz, D., Lemerle, J., and Sommelet, D. (1997) Loss of chromosome 1p may have a prognostic value in localised neuroblastoma: results of the French NBL 90 Study. Neuroblastoma Study Group of the Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique (SFOP). *Eur.J.Cancer* *33*, 1917-1922.
326. Ryden, M., Sehgal, R., Dominici, C., Schilling, F.H., Ibanez, C.F., and Kogner, P. (1996) Expression of mRNA for the neurotrophin receptor trkC in neuroblastomas with favourable tumour stage and good prognosis. *Br.J.Cancer* *74*, 773-779.
327. Safford, K.M., Hicok, K.C., Safford, S.D., Halvorsen, Y.D., Wilkison, W.O., Gimble, J.M., and Rice, H.E. (2002) Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* *294*, 371-379.
328. Safford, K.M., Safford, S.D., Gimble, J.M., Shetty, A.K., and Rice, H.E. (2004) Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp.Neurol.* *187*, 319-328.

329. Salghetti, S.E., Kim, S.Y., and Tansey, W.P. (1999) Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *EMBO J.* *18*, 717-726.
330. Sampson, V.B., Rong, N.H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, N.J., Dunn, S.P., and Krueger, L.J. (2007) MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* *67*, 9762-9770.
331. Sasai, N., Mizuseki, K., and Sasai, Y. (2001) Requirement of FoxD3-class signaling for neural crest determination in *Xenopus*. *Development* *128*, 2525-2536.
332. Sauka-Spengler, T., and Bronner-Fraser, M. (2006) Development and evolution of the migratory neural crest: a gene regulatory perspective. *Curr.Opin.Genet.Dev.* *16*, 360-366.
333. Sawai, S., Shimono, A., Hanaoka, K., and Kondoh, H. (1991) Embryonic lethality resulting from disruption of both N-myc alleles in mouse zygotes. *New Biol.* *3*, 861-869.
334. Scaal, M., Fuchtbauer, E.M., and Brand-Saberi, B. (2001) cDermo-1 expression indicates a role in avian skin development. *Anat.Embryol.(Berl)* *203*, 1-7.
335. Schleiermacher, G., Delattre, O., Peter, M., Mosseri, V., Delonlay, P., Vielh, P., Thomas, G., Zucker, J.M., Magdelenat, H., and Michon, J. (1996) Clinical relevance of loss heterozygosity of the short arm of chromosome 1 in neuroblastoma: a single-institution study. *Int.J.Cancer* *69*, 73-78.
336. Schreiber-Agus, N., and DePinho, R.A. (1998) Repression by the Mad(Mxi1)-Sin3 complex. *Bioessays* *20*, 808-818.
337. Schuhmacher, M., Staeger, M.S., Pajic, A., Polack, A., Weidle, U.H., Bornkamm, G.W., Eick, D., and Kohlhuber, F. (1999) Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr.Biol.* *9*, 1255-1258.
338. Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K.H., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Gilbert, F., Brodeur, G., Goldstein, M., and Trent, J. (1983) Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* *305*, 245-248.
339. Schwab, M., Varmus, H.E., and Bishop, J.M. (1985) Human N-myc gene contributes to neoplastic transformation of mammalian cells in culture. *Nature* *316*, 160-162.
340. Schwab, M., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Grzeschik, K.H., Naylor, S.L., Sakaguchi, A.Y., Brodeur, G., and Trent, J. (1984) Chromosome

- localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* *308*, 288-291.
341. Seeger, R.C., Brodeur, G.M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S.E., Wong, K.Y., and Hammond, D. (1985) Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N.Engl.J.Med.* *313*, 1111-1116.
 342. Seeger, R.C., Wada, R., Brodeur, G.M., Moss, T.J., Bjork, R.L., Sousa, L., and Slamon, D.J. (1988) Expression of N-myc by neuroblastomas with one or multiple copies of the oncogene. *Prog.Clin.Biol.Res.* *271*, 41-49.
 343. Serra, R., Pelton, R.W., and Moses, H.L. (1994) TGF beta 1 inhibits branching morphogenesis and N-myc expression in lung bud organ cultures. *Development* *120*, 2153-2161.
 344. Sharabi, A.B., Aldrich, M., Sosic, D., Olson, E.N., Friedman, A.D., Lee, S.H., and Chen, S.Y. (2008) Twist-2 controls myeloid lineage development and function. *PLoS.Biol.* *6*, e316.
 345. Shibata, K., Kajiyama, H., Ino, K., Terauchi, M., Yamamoto, E., Nawa, A., Nomura, S., and Kikkawa, F. (2008) Twist expression in patients with cervical cancer is associated with poor disease outcome. *Ann.Oncol.* *19*, 81-85.
 346. Shiota, M., Izumi, H., Onitsuka, T., Miyamoto, N., Kashiwagi, E., Kidani, A., Yokomizo, A., Naito, S., and Kohno, K. (2008) Twist promotes tumor cell growth through YB-1 expression. *Cancer Res.* *68*, 98-105.
 347. Sidell, N. (1982) Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J.Natl.Cancer Inst.* *68*, 589-596.
 348. Simpson, P. (1983) Maternal-Zygotic Gene Interactions during Formation of the Dorsoventral Pattern in *Drosophila* Embryos. *Genetics* *105*, 615-632.
 349. Sitcheran, R., Gupta, P., Fisher, P.B., and Baldwin, A.S. (2005) Positive and negative regulation of EAAT2 by NF-kappaB: a role for N-myc in TNFalpha-controlled repression. *EMBO J.* *24*, 510-520.
 350. Sivak, L.E., Tai, K.F., Smith, R.S., Dillon, P.A., Brodeur, G.M., and Carroll, W.L. (1997) Autoregulation of the human N-myc oncogene is disrupted in amplified but not single-copy neuroblastoma cell lines. *Oncogene* *15*, 1937-1946.
 351. Slack, A., Chen, Z., Tonelli, R., Pule, M., Hunt, L., Pession, A., and Shohet, J.M. (2005) The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *102*, 731-736.

352. Slack, A., and Shohet, J.M. (2005) MDM2 as a critical effector of the MYCN oncogene in tumorigenesis. *Cell Cycle* 4, 857-860.
353. Sokol, N.S., and Ambros, V. (2005) Mesodermally expressed *Drosophila* microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. *Genes Dev.* 19, 2343-2354.
354. Song, L.B., Liao, W.T., Mai, H.Q., Zhang, H.Z., Zhang, L., Li, M.Z., Hou, J.H., Fu, L.W., Huang, W.L., Zeng, Y.X., and Zeng, M.S. (2006) The clinical significance of twist expression in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.* 242, 258-265.
355. Sobic, D., Richardson, J.A., Yu, K., Ornitz, D.M., and Olson, E.N. (2003) Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity. *Cell* 112, 169-180.
356. Spengler, B.A., Lazarova, D.L., Ross, R.A., and Biedler, J.L. (1997) Cell lineage and differentiation state are primary determinants of MYCN gene expression and malignant potential in human neuroblastoma cells. *Oncol.Res.* 9, 467-476.
357. Spicer, D.B., Rhee, J., Cheung, W.L., and Lassar, A.B. (1996) Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist. *Science* 272, 1476-1480.
358. Spokony, R.F., Aoki, Y., Saint-Germain, N., Magner-Fink, E., and Saint-Jeannet, J.P. (2002) The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in *Xenopus*. *Development* 129, 421-432.
359. Srivastava, D., Cserjesi, P., and Olson, E.N. (1995) A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science* 270, 1995-1999.
360. Srivatsan, E.S., Ying, K.L., and Seeger, R.C. (1993) Deletion of chromosome 11 and of 14q sequences in neuroblastoma. *Genes Chromosomes.Cancer* 7, 32-37.
361. Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F., and Eilers, M. (2001) Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat.Cell Biol.* 3, 392-399.
362. Stanton, B.R., Perkins, A.S., Tessarollo, L., Sassoon, D.A., and Parada, L.F. (1992) Loss of N-myc function results in embryonic lethality and failure of the epithelial component of the embryo to develop. *Genes Dev.* 6, 2235-2247.
363. Stasinopoulos, I.A., Mironchik, Y., Raman, A., Wildes, F., Winnard, P., Jr., and Raman, V. (2005) HOXA5-twist interaction alters p53 homeostasis in breast cancer cells. *J.Biol.Chem.* 280, 2294-2299.

364. Steventon, B., Carmona-Fontaine, C., and Mayor, R. (2005) Genetic network during neural crest induction: from cell specification to cell survival. *Semin.Cell Dev.Biol.* 16, 647-654.
365. Stiewe, T., and Putzer, B.M. (2002) Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene? *Cell Death.Differ.* 9, 237-245.
366. Stoneley, M., Paulin, F.E., Le Quesne, J.P., Chappell, S.A., and Willis, A.E. (1998) C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene* 16, 423-428.
367. Sugiyama, A., Kume, A., Nemoto, K., Lee, S.Y., Asami, Y., Nemoto, F., Nishimura, S., and Kuchino, Y. (1989) Isolation and characterization of s-myc, a member of the rat myc gene family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86, 9144-9148.
368. Suzuki, T., Bogenmann, E., Shimada, H., Stram, D., and Seeger, R.C. (1993) Lack of high-affinity nerve growth factor receptors in aggressive neuroblastomas. *J.Natl.Cancer Inst.* 85, 377-384.
369. Suzuki, T., Yokota, J., Mugishima, H., Okabe, I., Ookuni, M., Sugimura, T., and Terada, M. (1989) Frequent loss of heterozygosity on chromosome 14q in neuroblastoma. *Cancer Res.* 49, 1095-1098.
370. Svensson, T., Ryden, M., Schilling, F.H., Dominici, C., Sehgal, R., Ibanez, C.F., and Kogner, P. (1997) Coexpression of mRNA for the full-length neurotrophin receptor trk-C and trk-A in favourable neuroblastoma. *Eur.J.Cancer* 33, 2058-2063.
371. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
372. Takayama, H., Suzuki, T., Mugishima, H., Fujisawa, T., Ookuni, M., Schwab, M., Gehring, M., Nakamura, Y., Sugimura, T., Terada, M., and . (1992) Deletion mapping of chromosomes 14q and 1p in human neuroblastoma. *Oncogene* 7, 1185-1189.
373. Takita, J., Hayashi, Y., Kohno, T., Shiseki, M., Yamaguchi, N., Hanada, R., Yamamoto, K., and Yokota, J. (1995) Allelotype of neuroblastoma. *Oncogene* 11, 1829-1834.
374. Takita, J., Hayashi, Y., Kohno, T., Yamaguchi, N., Hanada, R., Yamamoto, K., and Yokota, J. (1997) Deletion map of chromosome 9 and p16 (CDKN2A) gene alterations in neuroblastoma. *Cancer Res.* 57, 907-912.
375. Takita, J., Yang, H.W., Chen, Y.Y., Hanada, R., Yamamoto, K., Teitz, T., Kidd, V., and Hayashi, Y. (2001) Allelic imbalance on chromosome 2q and alterations of the caspase 8 gene in neuroblastoma. *Oncogene* 20, 4424-4432.

376. Talens-Visconti, R., Bonora, A., Jover, R., Mirabet, V., Carbonell, F., Castell, J.V., and Gomez-Lechon, M.J. (2007) Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: Differentiation into hepatic lineage. *Toxicol. In Vitro* 21, 324-329.
377. Tamura, M., and Noda, M. (1999) Identification of DERMO-1 as a member of helix-loop-helix type transcription factors expressed in osteoblastic cells. *J. Cell Biochem.* 72, 167-176.
378. Tanaka, T., Hiyama, E., Sugimoto, T., Sawada, T., Tanabe, M., and Ida, N. (1995) *trk A* gene expression in neuroblastoma. The clinical significance of an immunohistochemical study. *Cancer* 76, 1086-1095.
379. Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., and Leder, P. (1982) Translocation of the *c-myc* gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 79, 7837-7841.
380. Tauszig-Delamasure, S., Yu, L.Y., Cabrera, J.R., Bouzas-Rodriguez, J., Mermet-Bouvier, C., Guix, C., Bordeaux, M.C., Arumae, U., and Mehlen, P. (2007) The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104, 13361-13366.
381. Teitz, T., Wei, T., Valentine, M.B., Vanin, E.F., Grenet, J., Valentine, V.A., Behm, F.G., Look, A.T., Lahti, J.M., and Kidd, V.J. (2000) Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat. Med.* 6, 529-535.
382. Terauchi, M., Kajiyama, H., Yamashita, M., Kato, M., Tsukamoto, H., Umezumi, T., Hosono, S., Yamamoto, E., Shibata, K., Ino, K., Nawa, A., Nagasaka, T., and Kikkawa, F. (2007) Possible involvement of TWIST in enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *Clin. Exp. Metastasis* 24, 329-339.
383. Thiery, J.P. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442-454.
384. Thisse, B., el Messal, M., and Perrin-Schmitt, F. (1987) The twist gene: isolation of a *Drosophila* zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic Acids Res.* 15, 3439-3453.
385. Timeus, F., Crescenzo, N., Valle, P., Pistamiglio, P., Piglione, M., Garelli, E., Ricotti, E., Rocchi, P., Strippoli, P., Cordero di, M.L., Madon, E., Ramenghi, U., and Basso, G. (1997) Stem cell factor suppresses apoptosis in neuroblastoma cell lines. *Exp. Hematol.* 25, 1253-1260.
386. Tonini, G.P., Longo, L., Coco, S., and Perri, P. (2003) Familial neuroblastoma: a complex heritable disease. *Cancer Lett.* 197, 41-45.

387. Valsesia-Wittmann, S., Magdeleine, M., Dupasquier, S., Garin, E., Jallas, A.C., Combaret, V., Krause, A., Leissner, P., and Puisieux, A. (2004) Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 6, 625-630.
388. van Bokhoven, H., Celli, J., van Reeuwijk, J., Rinne, T., Glaudemans, B., van Beusekom, E., Rieu, P., Newbury-Ecob, R.A., Chiang, C., and Brunner, H.G. (2005) MYCN haploinsufficiency is associated with reduced brain size and intestinal atresias in Feingold syndrome. *Nat.Genet.* 37, 465-467.
389. van der, G.P., Hunter, T., and Lindberg, R.A. (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu.Rev.Cell Biol.* 10, 251-337.
390. van Lohuizen, M., Verbeek, S., Scheijen, B., Wientjens, E., van der, G.H., and Berns, A. (1991) Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 65, 737-752.
391. Van Roy, N., De Preter, K., Hoebeeck, J., Van Maerken, T., Pattyn, F., Mestdagh, P., Vermeulen, J., Vandesompele, J., and Speleman, F. (2009) The emerging molecular pathogenesis of neuroblastoma: implications for improved risk assessment and targeted therapy. *Genome Med.* 1, 74.
392. Van Roy, N., Laureys, G., Cheng, N.C., Willem, P., Opdenakker, G., Versteeg, R., and Speleman, F. (1994) 1;17 translocations and other chromosome 17 rearrangements in human primary neuroblastoma tumors and cell lines. *Genes Chromosomes.Cancer* 10, 103-114.
393. Vandesompele, J., Speleman, F., Van Roy, N., Laureys, G., Brinskchmidt, C., Christiansen, H., Lampert, F., Lastowska, M., Bown, N., Pearson, A., Nicholson, J.C., Ross, F., Combaret, V., Delattre, O., Feuerstein, B.G., and Plantaz, D. (2001) Multicentre analysis of patterns of DNA gains and losses in 204 neuroblastoma tumors: how many genetic subgroups are there? *Med.Pediatr.Oncol.* 36, 5-10.
394. Vangipuram, S.D., Wang, Z.J., and Lyman, W.D. (2009) Resistance of stem-like cells from neuroblastoma cell lines to commonly used chemotherapeutic agents. *Pediatr.Blood Cancer.*
395. Vennstrom, B., Sheiness, D., Zabielski, J., and Bishop, J.M. (1982) Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J.Virol.* 42, 773-779.
396. Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R., Jaenisch, R., Sharp, P.A., and Jacks, T. (2008) Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 132, 875-886.

397. Vervoorts, J., Luscher-Firzlaff, J.M., Rottmann, S., Lilischkis, R., Walsemann, G., Dohmann, K., Austen, M., and Luscher, B. (2003) Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep.* *4*, 484-490.
398. Vogan, K., Bernstein, M., Leclerc, J.M., Brisson, L., Brossard, J., Brodeur, G.M., Pelletier, J., and Gros, P. (1993) Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas. *Cancer Res.* *53*, 5269-5273.
399. Wada, R.K., Seeger, R.C., Brodeur, G.M., Einhorn, P.A., Rayner, S.A., Tomayko, M.M., and Reynolds, C.P. (1993) Human neuroblastoma cell lines that express N-myc without gene amplification. *Cancer* *72*, 3346-3354.
400. Wagner, A.J., Kokontis, J.M., and Hay, N. (1994) Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21waf1/cip1. *Genes Dev.* *8*, 2817-2830.
401. Wakamatsu, Y., Watanabe, Y., Nakamura, H., and Kondoh, H. (1997) Regulation of the neural crest cell fate by N-myc: promotion of ventral migration and neuronal differentiation. *Development* *124*, 1953-1962.
402. Waldmann, J., Slater, E.P., Langer, P., Buchholz, M., Ramaswamy, A., Walz, M.K., Schmid, K.W., Feldmann, G., Bartsch, D.K., and Fendrich, V. (2009) Expression of the transcription factor snail and its target gene twist are associated with malignancy in pheochromocytomas. *Ann.Surg.Oncol.* *16*, 1997-2005.
403. Wallerand, H., Robert, G., Pasticier, G., Ravaud, A., Ballanger, P., Reiter, R.E., and Ferriere, J.M. (2009) The epithelial-mesenchymal transition-inducing factor TWIST is an attractive target in advanced and/or metastatic bladder and prostate cancers(). *Urol.Oncol.*
404. Walton, J.D., Kattan, D.R., Thomas, S.K., Spengler, B.A., Guo, H.F., Biedler, J.L., Cheung, N.K., and Ross, R.A. (2004) Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia.* *6*, 838-845.
405. Wang, X., Ling, M.T., Guan, X.Y., Tsao, S.W., Cheung, H.W., Lee, D.T., and Wong, Y.C. (2004) Identification of a novel function of TWIST, a bHLH protein, in the development of acquired taxol resistance in human cancer cells. *Oncogene* *23*, 474-482.
406. Wang, Z.R., Liu, W., Smith, S.T., Parrish, R.S., and Young, S.R. (1999) c-myc and chromosome 8 centromere studies of ovarian cancer by interphase FISH. *Exp.Mol.Pathol.* *66*, 140-148.
407. Watanabe, O., Imamura, H., Shimizu, T., Kinoshita, J., Okabe, T., Hirano, A., Yoshimatsu, K., Konno, S., Aiba, M., and Ogawa, K. (2004) Expression of twist and wnt in human breast cancer. *Anticancer Res.* *24*, 3851-3856.

408. Watson, D.K., Psallidopoulos, M.C., Samuel, K.P., Dalla-Favera, R., and Papas, T.S. (1983) Nucleotide sequence analysis of human c-myc locus, chicken homologue, and myelocytomatosis virus MC29 transforming gene reveals a highly conserved gene product. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *80*, 3642-3645.
409. Wenzel, A., Cziepluch, C., Hamann, U., Schurmann, J., and Schwab, M. (1991) The N-Myc oncoprotein is associated in vivo with the phosphoprotein Max(p20/22) in human neuroblastoma cells. *EMBO J.* *10*, 3703-3712.
410. Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* *448*, 318-324.
411. Westermann, F., Muth, D., Benner, A., Bauer, T., Henrich, K.O., Oberthuer, A., Brors, B., Beissbarth, T., Vandesompele, J., Pattyn, F., Hero, B., Konig, R., Fischer, M., and Schwab, M. (2008) Distinct transcriptional MYCN/c-MYC activities are associated with spontaneous regression or malignant progression in neuroblastomas. *Genome Biol.* *9*, R150.
412. Westermann, F., and Schwab, M. (2002) Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer Lett.* *184*, 127-147.
413. White, P.S., Maris, J.M., Beltinger, C., Sulman, E., Marshall, H.N., Fujimori, M., Kaufman, B.A., Biegel, J.A., Allen, C., Hilliard, C., and . (1995) A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *92*, 5520-5524.
414. Wilzen, A., Nilsson, S., Sjoberg, R.M., Kogner, P., Martinsson, T., and Abel, F. (2009) The Phox2 pathway is differentially expressed in neuroblastoma tumors, but no mutations were found in the candidate tumor suppressor gene PHOX2A. *Int.J.Oncol.* *34*, 697-705.
415. Wolf, C., Thisse, C., Stoetzel, C., Thisse, B., Gerlinger, P., and Perrin-Schmitt, F. (1991) The M-twist gene of Mus is expressed in subsets of mesodermal cells and is closely related to the Xenopus X-twi and the Drosophila twist genes. *Dev.Biol.* *143*, 363-373.
416. Wood, M.A., McMahon, S.B., and Cole, M.D. (2000) An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol.Cell* *5*, 321-330.
417. Woods, W.G., Tuchman, M., Bernstein, M.L., Leclerc, J.M., Brisson, L., Look, T., Brodeur, G.M., Shimada, H., Hann, H.L., Robison, L.L., and . (1992) Screening for neuroblastoma in North America. 2-year results from the Quebec Project. *Am.J.Pediatr.Hematol.Oncol.* *14*, 312-319.

418. Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D.P., Patterson, H.C., Zhang, B., Wang, J., Henderson, J.M., Kutok, J.L., and Rajewsky, K. (2008) Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat.Immunol.* *9*, 405-414.
419. Xie, F., Li, K., and Ouyang, X. (2009) Twist, an independent prognostic marker for predicting distant metastasis and survival rates of esophageal squamous cell carcinoma patients. *Clin.Exp.Metastasis.*
420. Xu, J., and Chen, X. (2007) Expression of twist gene in primary liver cancer. *J.Huazhong.Univ Sci.Technolog.Med.Sci.* *27*, 668-670.
421. Yagi, K., Furuhashi, M., Aoki, H., Goto, D., Kuwano, H., Sugamura, K., Miyazono, K., and Kato, M. (2002) c-myc is a downstream target of the Smad pathway. *J.Biol.Chem.* *277*, 854-861.
422. Yamashiro, D.J., Nakagawara, A., Ikegaki, N., Liu, X.G., and Brodeur, G.M. (1996) Expression of TrkC in favorable human neuroblastomas. *Oncogene* *12*, 37-41.
423. Yan-Qi, Z., Xue-Yan, G., Shuang, H., Yu, C., Fu-Lin, G., Fei-Hu, B., Shi-Ren, S., Xu-Feng, W., Jie, D., and Dai-Ming, F. (2007) Expression and significance of TWIST basic helix-loop-helix protein over-expression in gastric cancer. *Pathology* *39*, 470-475.
424. Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* *117*, 927-939.
425. Yang, M.H., Wu, M.Z., Chiou, S.H., Chen, P.M., Chang, S.Y., Liu, C.J., Teng, S.C., and Wu, K.J. (2008) Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat.Cell Biol.* *10*, 295-305.
426. Yang, Z., Zhang, X., Gang, H., Li, X., Li, Z., Wang, T., Han, J., Luo, T., Wen, F., and Wu, X. (2007) Up-regulation of gastric cancer cell invasion by Twist is accompanied by N-cadherin and fibronectin expression. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* *358*, 925-930.
427. Yano, T., Jaffe, E.S., Longo, D.L., and Raffeld, M. (1992) MYC rearrangements in histologically progressed follicular lymphomas. *Blood* *80*, 758-767.
428. Yeh, E., Cunningham, M., Arnold, H., Chasse, D., Monteith, T., Ivaldi, G., Hahn, W.C., Stukenberg, P.T., Shenolikar, S., Uchida, T., Counter, C.M., Nevins, J.R., Means, A.R., and Sears, R. (2004) A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat.Cell Biol.* *6*, 308-318.
429. Yuen, H.F., Chan, Y.P., Wong, M.L., Kwok, W.K., Chan, K.K., Lee, P.Y., Srivastava, G., Law, S.Y., Wong, Y.C., Wang, X., and Chan, K.W. (2007a)

- Upregulation of Twist in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with neoplastic transformation and distant metastasis. *J.Clin.Pathol.* *60*, 510-514.
430. Yuen, H.F., Chua, C.W., Chan, Y.P., Wong, Y.C., Wang, X., and Chan, K.W. (2007b) Significance of TWIST and E-cadherin expression in the metastatic progression of prostatic cancer. *Histopathology* *50*, 648-658.
431. Yuen, H.F., Kwok, W.K., Chan, K.K., Chua, C.W., Chan, Y.P., Chu, Y.Y., Wong, Y.C., Wang, X., and Chan, K.W. (2008) TWIST modulates prostate cancer cell-mediated bone cell activity and is upregulated by osteogenic induction. *Carcinogenesis* *29*, 1509-1518.
432. Zeller, K.I., Haggerty, T.J., Barrett, J.F., Guo, Q., Wonsey, D.R., and Dang, C.V. (2001) Characterization of nucleophosmin (B23) as a Myc target by scanning chromatin immunoprecipitation. *J.Biol.Chem.* *276*, 48285-48291.
433. Zhang, X., Wang, Q., Ling, M.T., Wong, Y.C., Leung, S.C., and Wang, X. (2007a) Anti-apoptotic role of TWIST and its association with Akt pathway in mediating taxol resistance in nasopharyngeal carcinoma cells. *Int.J.Cancer* *120*, 1891-1898.
434. Zhang, Z., Xie, D., Li, X., Wong, Y.C., Xin, D., Guan, X.Y., Chua, C.W., Leung, S.C., Na, Y., and Wang, X. (2007b) Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer. *Hum.Pathol.* *38*, 598-606.
435. Zhu, Q., Xu, H., Xu, Q., Yan, W., and Tian, D. (2008) Expression of Twist gene in human hepatocellular carcinoma cell strains of different metastatic potential. *J.Huazhong.Univ.Sci.Technolog.Med.Sci.* *28*, 144-146.
436. Zhu, X., Wimmer, K., Kuick, R., Lamb, B.J., Motyka, S., Jasty, R., Castle, V.P., and Hanash, S.M. (2002) N-myc modulates expression of p73 in neuroblastoma. *Neoplasia.* *4*, 432-439.
437. Zhuo, W.L., Wang, Y., Zhuo, X.L., Zhang, Y.S., and Chen, Z.T. (2008) Short interfering RNA directed against TWIST, a novel zinc finger transcription factor, increases A549 cell sensitivity to cisplatin via MAPK/mitochondrial pathway. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* *369*, 1098-1102.
438. Zimmerman, K.A., Yancopoulos, G.D., Collum, R.G., Smith, R.K., Kohl, N.E., Denis, K.A., Nau, M.M., Witte, O.N., Toran-Allerand, D., Gee, C.E., and . (1986) Differential expression of myc family genes during murine development. *Nature* *319*, 780-783.
439. Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., and Rousel, M.F. (1998) Myc signaling via the ARF tumor suppressor

- regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* *12*, 2424-2433.
440. Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol.Biol.Cell* *13*, 4279-4295.
441. Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* *7*, 211-228.

ANNEXES

ANNEXES : PUBLICATIONS

En préparation

Selmi A, Magdeleine M, Besançon R, Bouchet BP, Garin E, Jallas AC, Hogarty MD, Jean Bénard, Puisieux A, Valsesia-Wittmann S. MYCN protein induces selective *TWIST1* expression in Neuroblastoma cells.

MYCN protein induces selective *TWIST1* expression in Neuroblastoma cells.

Abdelkader Selmi^{1,2,3,4}, Maud Magdeleine^{1,2}, Roger Besançon^{1,2,3,4}, Benjamin P Bouchet^{1,2,3,4}, Elisabeth Garin⁵, Anne-Catherine Jallas⁵, Michael D Hogarty^{6,7}, Jean Bénard^{8,9}, Alain Puisieux^{1,2,3,4,5} and Sandrine Valsesia-Wittmann^{1,2,4,5,*}.

¹Université de Lyon, Lyon, F-69007, France; ²Université Lyon 1, ISPB, Lyon, F-69008, France; ³Inserm, U590, Lyon, F-69008, France; ⁴IFR62, Lyon, F-69008, France; ⁵Centre Léon Bérard, laboratoire de Recherche Translationnelle, Lyon, F-69008, France; ⁶Division of Oncology, The Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA, USA; ⁷Department of Pediatrics, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA; ⁸CNRS-UMR 8126, IFR54, Villejuif, F-94805 Cedex, France; ⁹Institut Gustave Roussy, Villejuif, F-94805 Cedex, France

* Corresponding author: wittmann@lyon.fnclcc.fr

Keywords

Neuroblastoma, *MYCN*, *TWIST1*, *TWIST2*, *c-MYC*, *MYCN* Amplified, Apoptosis, Transcriptional Regulation

Abstract

The *MYCN* gene is amplified in 20-25% of human Neuroblastoma (NB), associated with poor clinical outcome. We previously reported a constant deregulation of *TWIST1* in synergy with *MYCN* in aggressive stage IV NB harbouring *MYCN* amplification (Valsesia-Wittmann et al. 2004). We observed a correlation between *MYCN* and *TWIST1* overexpression both in NB tumors and cell lines. The correlation between *MYC* (*MYCN* or *c-MYC*) and *TWIST1* was not observed in colorectal cancer or breast carcinoma. This correlation appeared to be specific to NB. Interestingly, we observed that modulation of *MYCN* or *c-MYC* expression leads to *TWIST1* variation suggesting that *TWIST1* may be a transcriptional target of Myc proteins, MycN and c-Myc. We further confirmed by EMSA and by reporter activity, that MycN and c-Myc protein could bind and activate *TWIST1* promoter.

Our results suggest that overexpression of MycN protein, in *MYCN* overexpressing Neuroblastoma (*MYCN* amplified or Simple Copy) induces a selective deregulation of *TWIST1* expression, acting as a survival factor inhibiting p53-dependant apoptosis induced by *MYCN*. Therefore, deregulation and amplification of *MYCN* in aggressive NB tumors can induce selective expression of *TWIST1* oncogene, responsible for apoptosis resistance.

Introduction

The Myc family proteins (c-Myc, MycN or L-Myc) are potent oncogenes that can activate or repress a very large number of cellular target genes. Deregulation of Myc family members is found in different human cancers (Nesbit et al. 1999). The most striking association is observed for *MYCN* with Neuroblastoma (NB) (Brodeur 1995). NB is one of the most common neonatal solid tumors that remain frequently lethal in childhood. NB is a tumor of neural crest origin, in which the *MYCN* gene can be found amplified more than hundredfold (Brodeur et al. 1984). This amplification is influential in the pathology since tumors containing such amplification are strongly associated with metastasis, disease progression and high rate mortality (Norris et al. 2000). Although it is clear that *MYCN* deregulation is associated with aggressiveness, molecular mechanisms by which *MYCN* contribute to neoplastic phenotype are not fully understood. We previously reported a model in which synergic deregulation of *TWIST1* with *MYCN* cooperates for transformation of *MYCN* amplified (MNA) NB (Valsesia-Wittmann et al. 2004). This model gives a rational explanation for the lack of apoptosis in MNA NB in the context of a wild type p53 (Imamura et al. 1993; Vogan et al. 1993; Komuro et al. 1993; Hosoi et al. 1994; Castresana et al. 1994).

The *MYCN* gene encodes a nuclear phosphoprotein containing several distinct domains: a stretch of basic amino acids followed by basic helix-loop-helix-leucine zipper motifs involved in DNA binding and proteins dimerization. MycN protein regulates gene expression at transcriptional level by dimerization with itself or other helix-loop-helix proteins and the resulting complex binds to DNA E-box sequences (CANNTG) of regulated genes (Blackwood and Eisenman 1991; Blackwell et al. 1993). Microarrays analysis revealed that MycN protein regulates genes

involved in growth, cell cycle, signaling and adhesion (Kenney et al. 2004; Oliver et al. 2003; Schuldiner and Benvenisty 2001). It is known that MycN protein plays a crucial role in cell proliferation and migration as well as maintenance of an undifferentiated state (Wakamatsu et al. 1997).

Few genes expression have been shown correlated with MycN protein level, including ornithine decarboxylase 1 (*ODC*), *PTMA*, *IGF1R*, *hTERT*... (Lutz et al. 1996; Chambery et al. 1999; Hiyama et al. 1999). All of which have E-boxes in or near the promoter. Expression of others gene such as *MRP*, integrins, or neural cell adhesion molecule has been shown influenced by MycN levels. (Judware and Culp 1997; Haber et al. 1999). However, it is not clear whether any of these genes are directly regulated by MycN binding to the promoter so that they can be determined as direct MycN targets.

In different systems, latency is observed between *MYCN* overexpression and tumor development suggesting that secondary events are required and selected to cause neoplasia. Although cellular mechanism by which *MYCN* can induce neoplastic phenotype can be postulate based on its properties to complete cell cycle or decrease attachments of cells to cellular matrix, molecular mechanisms remain to be elucidated.

Here, we highlighted *TWIST1* as transcriptional targets of MycN protein that could account for aggressive prognostic of NB tumors. *TWIST1* are basic helix-loop-helix transcription factors that have important and partially redundant functions during embryogenesis (Leptin and Grunewald 1990; Bialek et al. 2004). We previously reported that a large fraction of human cancers overexpress *TWIST1* and that both proteins are able to abrogate key regulators of p53- Rb-dependent pathways (Maestro et al. 1999; Valsesia-Wittmann et al. 2004; Ansieau et al. 2008).

TWIST1 has been shown to favor the metastatic dissemination of cancer cells through its ability to induce an epithelial to mesenchymal transition (EMT), as well as chromosomal instability, resistance to chemotherapeutical drugs and survival (Yang et al. 2004; Kwok et al. 2005; Mironchik et al. 2005). We therefore propose that selective upregulation of *TWIST* oncoproteins by MycN in immature NB cells,

could be responsible for aggressiveness phenotype of MNA NB. These observations give a molecular explanation for the low overall survival of stage IV NB.

Experimental procedures

Cell culture and transfections

NB cell lines, previously described (Lutz et al. 1996), were cultured at 37°C, under 5% CO₂, using RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2% L-Glutamine and penicillin/streptomycin solution (10,000U/mL; 10,000µg/ml) (Gibco®). Cell lines were either transfected using Exgen 500 (MBI Fermentas©) for the plasmids transfections or Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen™) for siRNA transfections according to the manufacturer's recommendations.

Tet21N, SHEP subclones ectopically overexpressing *MYCN*, were generous gifts from Dr. Manfred Schwab (German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany). These cells were cultured in the same medium as other NB cell lines supplemented with ampicilline (250 mg/mL) and hygromycine (200 mg/mL). Expression of the extrachromosomal *MYCN* construct was conditionally regulated by the addition or removal of 1 µg/mL tetracycline; *MYCN* expression is suppressed by addition of tetracycline, while the removal of tetracycline results in abundant expression of *MYCN*.

Protein lysate preparation and immunoblotting

Cell pellets were lysed 30 minutes on ice in cold lysis buffer (Tris-HCl 20mM pH 7.6, Triton 1x, SDS 0.05%, Na deoxycholate 0.5%, NaCl 150mM) containing 0.5 mM PMSF and protein inhibitor cocktails (Sigma-Aldrich®). 50 to 100µg total protein were separated on an SDS-PAGE. Western blot analysis was performed using mouse monoclonal anti-MycN antibody (#556438, BD Pharmingen™), rabbit polyclonal anti-*TWIST1* antibody (#4119, Cell Signaling Technology®) and mouse anti-β-Actin antibody AC15 (Sigma-Aldrich®). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (#31460) or anti-mouse (#31430) antibodies (Thermo Scientific) were used as secondary antibodies. Western-Blots were revealed using the Supersignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific).

RNA preparation and Real-Time quantitative RT-PCR

RNA was extracted using the TRI® Reagent solution (Sigma-Aldrich®) on Phase Lock Gel™ Heavy tubes (Eppendorf®). 1µg of total RNA was reverse-transcribed to synthesize complementary DNA using the high capacity cDNA RT synthesis kit (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was carried out with the LightCycler® TaqMan® or FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I master mix and analyzed using the LightCycler® 2.0 System (Roche). Specific primers and probes were previously described (Ansieau et al. 2008; Valsesia-Wittmann et al. 2004). Primers pair were AGCCGTTGGTGTCTTTGC and ACTTCACCAGGGGAGATGG for the *CPB1* gene, GGAAGATGAAGAGGAAGAAATCG and CTTGGGACGCACAGTGATGGTG for *MYCN* gene and CTGTCGTCTCAGTGTGAAATTCG and CGCCCGTTCCAAAAGGA for *ODC* gene.

Housekeeping genes (*ATP6AP1*, *CFL1*, *CPB1*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1*, *PGK1*, *PPIB*, *TBP*, *TFRC*, *TUBA1C* and *UBB*), used for normalization of target mRNA expression in each sample type, were selected by systematic geNorm analysis as previously described (Vandesompele et al. 2002).

The expression of each gene was normalized using two housekeeping genes.

RNA interference

Two siRNA were used to inhibit *TWIST1* expression: Twist5-siRNA CAGCGAGGAAGAGCCAGACCG and Twist3-siRNA GAUGGCAAGCUGCAGCUAUGU. And one siRNA was used for *MYCN*: *MYCN*_Ex2 CCCGGUCAUCCUCCAGGAC.

A scramble siRNA (AGCGCGCTTTGTAGGATTCG) was designed and used as control. Selected siRNA sequences were submitted to a BLAST search against the human genome sequence to ensure specificity. siRNA were transfected as duplexes by using Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen™) according to the manufacturer's recommendations.

Reporter assays

The reporter construct were obtained by cloning in the pGL3-enhancer plasmid (Promega) different fragments of *TWIST1* promoter: “minimum”, “2E-box”, “1E-boxS”, “1E-boxAS”, “1E-boxS mut”, “1E-boxAS mut” (S for sens, AS for Anti-Sens) (figure 5A). The 1E-box “mut” fragment was obtained by mutating the E-box CACGTG in CACGGT with the QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) conforming to the manufacturer's recommendations. The NB cells

SHEP were co-transfected in 6 well plates with 2 µg of reporter construct, 1.7 µg of expression vector and 0.3 µg of internal pRL-TK-luc construct (Promega) per well, using Exgen 500 (MIB Fermentas). Luciferase activity was monitored 24h after the transfection using the Dual-luciferase reporter assay system (Promega) and a luminometer (Luminoskan Ascent®, Thermo Scientific).

Electrophoretic mobility-shift assays

Nuclear protein extract were performed with the Nuclear Extract Kit (Active Motif) from several NB cell lines. The extracts were used for binding reactions with 3'end biotinylated and non-marked probes. The different sequences targeted 5 regions of *TWIST1* promoter: GCATTGCCAGCTGTTAGGGCC (E-box1), CTCCAGCGCGGTGCACAAAAC (xob-E2), ACAGCCACGTGGCCTGCCTGC (E-box3), CCACGCGTCGCCGCTCGAGAG (non consensus) and TAGGCGCTATCAAATCCCACTTCACTCTCTTACAAGCT (INR).

DNA-binding reactions were performed with the LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's recommendations. Competition assays were done with unlabeled probes. For supershift assays, proteins were pre-incubated with 0.5 µg of antibodies for 20 min at room temperature before addition of the probe. The antibody used was the mouse monoclonal anti-MycN antibody (#556438, BD Pharmingen™).

Results

MYCN overexpression is correlated with *TWIST1* expression in NB

We previously showed an oncogenic cooperation between *MYCN* and *TWIST1* in NB (Valesia-Wittmann et al. 2004). To extend our previous observation about *MYCN* and *TWIST1* expression correlation, we evaluated *TWIST1* and *MYCN* in NB tumors (n= 124) from the Gustave Roussy Institutue (Paris, France) (**table 1**). These samples represented the different NB stages 1 (n = 11), 2 (n = 13), 3 (n = 9), 4 (n=74) and 4S (n = 17). The correlation between *MYCN* and *TWIST1* expression was confirmed (Pearson = 0.807, p<2.2E-16). The analysis of tumor samples (n = 20) from the Texas Children Hospital, also confirmed the correlation between *MYCN* and *TWIST1* expression for MNA tumors (**figure S1**). These results suggest that *TWIST1* expression is correlated with *MYCN* overexpression.

The striking association observed between *MYCN* overexpression and *TWIST1* expression suggests that *TWIST1* might be a transcriptional target of *MYCN* in NB cells.

No correlation between *TWIST1* and Myc proteins in carcinoma models

c-Myc deregulation is a frequent event in colon carcinoma (Erisman et al. 1985) and breast carcinoma (Escot et al. 1986). In order to generalize the synergy of expression between *TWIST1* and *MYCN* observed in NB to a correlation between *TWIST1* and Myc oncoproteins (MycN or *c-Myc*) in other cancers, we evaluated *TWIST1*, *MYCN* and *c-MYC* expression in breast and colon carcinoma tumors.

TWIST1, *MYCN* and *c-MYC* expression were analyzed by quantitative RT-PCR in colon carcinoma (n = 10) and 14 breast tumors (n = 14). We confirmed the deregulation of *c-MYC* oncogene in 9 of 10 colon carcinoma (**figure 1A**) and in 9 of 14 (64.3%) breast tumors (**figure 1B**). Although some biopsies expressed *TWIST1*, there was no correlation of expression between *c-MYC* or *MYCN* and *TWIST1* overexpression neither in colon carcinoma (**figure 1A**) nor in breast cancer (**figure 1B**). Our results indicate that correlation of *TWIST1* and *MYCN* expression is restricted to NB.

Myc overexpression induces *TWIST1* expression in NB cells

To investigate the relation between *MYCN* and *TWIST1* in NB, 1 μ g of *MYCN* or *c-MYC* plasmid was transfected in SHEP cell line. *ODC* was used as positive control.

Overexpression of *MYCN* or *c-MYC* (**figure 2A**) induced an increase of *TWIST1* and *ODC* expression (**figure 2B**) suggesting that overexpression of *MYCN* or *c-MYC* could induce *TWIST1* expression.

Induction kineticss were realized by stopping tetracycline treatment in Tet21N cell. This resulted in induction of *MYCN* mRNA expression in these cells (**figure 2C**). *ODC* had a similar pattern than *MYCN* mRNA expression. *TWIST1* expression presented two peaks near 24-28h and after 72h (**figure 2C**). These results were also confirmed by Western-Blot analysis at the protein level (**data not shown**).

Inhibition of *MYCN* expression has no effect on *TWIST1* expression in NB cells

MYCN expression was inhibited by RNA interference in NB cell lines. Results obtained indicated that *MYCN* expression was drastically inhibited (**figure 3A**). In this condition, no significant effect was observed other *TWIST1* and *ODC* expression (**figure 3A**). We also observed an increase of *c-MYC* expression when *MYCN* is inhibited.

Repression kineticss were obtained by treatment with tetracycline after a release of it first. The inhibition of *MYCN* mRNA expression was checked (**figure 3B**). *TWIST1* mRNA expression was increased during all the kinetics with the highest amount at 96h. Reversely, *ODC* expression was inhibited, except for t = 96h. *c-MYC* expression was first activated (t = 16h), inhibited up to 88h, and then increased at 96h (**figure 3B**).

These data suggest that when *MYCN* expression is inhibited, *c-MYC* is induced, and, that *c-MYC* might be able to maintain *TWIST1* expression in absence of *MYCN*.

Myc proteins bind to E-boxes of *TWIST1* promoter

Most of the Myc proteins targets are activated through Myc proteins binding to E-box motives (CANNTG) (Blackwood and Eisenman 1991; Blackwell et al. 1993). Because *TWIST1* promoter contains several E-boxes, we wished determine wether Myc proteins bind *TWIST1* promoter to induce its expression. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) and supershift assays where done using *TWIST1* promoter probes, nuclear protein extracts and antibodies against MycN or c-Myc. With EMSA, we first showed that the nuclear protein extracts of IGRN91, SHEP, WAC and SK-N-SH, could bind the 5 selected regions containing E-box or INR (**dat not shown**).

To confirm that the nuclear extract contained MycN or c-Myc protein, supershift assays were done with MycN antibody and c-Myc antibody. With IGRN91 and SHEP nuclear extracts, we showed that MycN and c-Myc proteins were able to bind to the INR fragment of the *TWIST1* promoter (**figure 4**). MycN and c-Myc proteins could also bind to the E-box1 in SK-N-SH and to the xob-E2 in WAC cells (**figure 4**).

***TWIST1* promoter is activated by Myc proteins**

To show that Myc protein can activate *TWIST1* promoter, we used the pGL3-enhancer reporter system to study the activation of different parts of *TWIST1*

promoter (**figure 5A**). The activation of these regions after co-transfection with *MYCN* or *c-MYC* was compared to the empty reporter. The pODC, which contained *ODC* promoter, construct was used as positive control. With *MYCN* transfection, a significant activation was observed for the three constructs 2E-box, 1E-boxAS and minimum (**figure 5B**). For 1E-boxS, there was not a significant activation. With *c-MYC* transfection, a significant activation was observed for the constructs 1E-boxS and 1E-boxAS (**figure 5B**).

In order to determine whether the activation of the reporter is due to the E-boxes, the E-box contained in the constructs 1E-boxS and 1E-boxAS was mutated from CACGTG to CACGGT. With *MYCN*, 1E-boxASmut was less activated than the wild type whereas 1E-boxSmut was more activated than the wild type 1E-boxS (**figure 5B**). With *c-MYC*, the two couples behaved in the similar way: the mutated construct was less activated than the wild type one (**figure 5B**).

These results suggest first that MycN and c-Myc proteins may activate *TWIST1* promoter and that the activation of the *TWIST1* promoter is partially dependent of *TWIST1* E-boxes.

Discussion

Neuroblastoma is one of the few human cancers that present a wildtype *TP53* gene (Imamura et al. 1993; Vogan et al. 1993; Komuro et al. 1993; Hosoi et al. 1994; Castresana et al. 1994). However in this context, oncogenic activation of *MYCN* does not cause apoptosis of tumor cells. The identification of *TWIST1* as a survival factor in NB (Valsesia-Wittmann et al. 2004) offered a new point of view over this cancer.

Here we showed that *TWIST1* is expressed in numerous NB and that its expression is correlated with *MYCN* overexpression. And, because this correlation is specific to NB, NB cells should have a specific cellular context.

Our results indicate that *TWIST1* may be a direct transcriptional target of *MYCN* but also of c-Myc. However, we didn't lead the experiment to identify the mechanism and the partners of myc protein for the regulation of *TWIST1* gene.

An interesting part is that *TWIST1* is a bHLH transcription factor. So we can wonder if *TWIST1* might be able to regulate *MYCN* expression so that there would be a loop between these two main transcription factors.

There is not yet an efficient therapy to cure NB with *MYCN* amplification. We propose that *TWIST1* might be a target for drug treatment. Because *TWIST1* can inhibit p53-dependant apoptosis induced by *c-Myc* and *MYCN* (Maestro et al. 1999; Valsesia-Wittmann et al. 2004) and can induce EMT (Yang et al. 2004; Ansieau et al. 2008), blocking *TWIST1* expression or activity could reactivate cell apoptosis and avoid EMT. This could stop tumor progression and inhibit metastasis processes. This therapy could be first used in aggressive NB. However, *TWIST1* expression was detected in many cancers: breast (Yang et al. 2004; Watanabe et al. 2004), pancreas (Ohuchida et al. 2007), prostate (Kwok et al. 2005), melanomas (Hoek et al. 2004), osteosarcomas (Entz-Werle et al. 2005). So, *TWIST1* therapies could be also used to treat various tumors.

As *MyCN* belong to *Myc* family proteins, *TWIST1* has a homologous protein *TWIST2* (or *DERM01*). *TWIST2* is also able to inhibit p53-dependant apoptosis induced by *c-Myc* (Maestro et al. 1999) and is expressed in various cancers

Acknowledgements

This work was supported by grants from INSERM, la Ligue contre le Cancer, l'INCA and the Association pour la Recherche sur le Cancer. The authors thank M. Schwab for providing cosmid pMp34.1 and Tet21N cells. They are grateful to..... for critical reading of the manuscript and to C. Bergeron for providing clinical data and materials.

Reference List

- Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, Fauvet F, Puisieux I, Doglioni C, Piccinin S, Maestro R, Voeltzel T, Selmi A, Valsesia-Wittmann S, Caron dF and Puisieux A. (2008). *Cancer Cell*, 14, 79-89.
- Bialek P, Kern B, Yang X, Schrock M, Sosic D, Hong N, Wu H, Yu K, Ornitz DM, Olson EN, Justice MJ and Karsenty G. (2004). *Dev Cell*, 6, 423-435.
- Blackwell TK, Huang J, Ma A, Kretzner L, Alt FW, Eisenman RN and Weintraub H. (1993). *Mol Cell Biol*, 13, 5216-5224.
- Blackwood EM and Eisenman RN. (1991). *Science*, 251, 1211-1217.
- Brodeur GM. (1995). *Eur J Cancer*, 31A, 505-510.
- Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE and Bishop JM. (1984). *Science*, 224, 1121-1124.
- Castresana JS, Bello MJ, Rey JA, Nebreda P, Queizan A, Garcia-Miguel P and Pestana A. (1994). *Genes Chromosomes Cancer*, 10, 136-138.
- Chambery D, Mohseni-Zadeh S, de Galle B and Babajko S. (1999). *Cancer Res*, 59, 2898-2902.
- Entz-Werle N, Stoetzel C, Berard-Marec P, Kalifa C, Brugiere L, Pacquement H, Schmitt C, Tabone MD, Gentet JC, Quillet R, Oudet P, Lutz P, Babin-Boilletot A, Gaub MP and Perrin-Schmitt F. (2005). *Int J Cancer*, 117, 349-355.
- Erisman MD, Rothberg PG, Diehl RE, Morse CC, Spandorfer JM and Astrin SM. (1985). *Mol Cell Biol*, 5, 1969-1976.
- Escot C, Theillet C, Lidereau R, Spyrtatos F, Champeme MH, Gest J and Callahan R. (1986). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 4834-4838.
- Haber M, Bordow SB, Gilbert J, Madafiglio J, Kavallaris M, Marshall GM, Mechetner EB, Fruehauf JP, Tee L, Cohn SL, Salwen H, Schmidt ML and Norris MD. (1999). *Oncogene*, 18, 2777-2782.
- Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Fukuba I, Yamaoka H, Shay JW and Matsuura Y. (1999). *Clin Cancer Res*, 5, 601-609.
- Hoek K, Rimm DL, Williams KR, Zhao H, Ariyan S, Lin A, Kluger HM, Berger AJ, Cheng E, Trombetta ES, Wu T, Niinobe M, Yoshikawa K, Hannigan GE and Halaban R. (2004). *Cancer Res*, 64, 5270-5282.
- Hosoi G, Hara J, Okamura T, Osugi Y, Ishihara S, Fukuzawa M, Okada A, Okada S and Tawa A. (1994). *Cancer*, 73, 3087-3093.
- Imamura J, Bartram CR, Berthold F, Harms D, Nakamura H and Koeffler HP. (1993). *Cancer Res*, 53, 4053-4058.
- Judware R and Culp LA. (1997). *Oncogene*, 14, 1341-1350.
- Kenney AM, Widlund HR and Rowitch DH. (2004). *Development*, 131, 217-228.
- Komuro H, Hayashi Y, Kawamura M, Hayashi K, Kaneko Y, Kamoshita S, Hanada R, Yamamoto K, Hongo T, Yamada M and . (1993). *Cancer Res*, 53, 5284-5288.
- Kwok WK, Ling MT, Lee TW, Lau TC, Zhou C, Zhang X, Chua CW, Chan KW, Chan FL, Glackin C, Wong YC and Wang X. (2005). *Cancer Res*, 65, 5153-5162.
- Leptin M and Grunewald B. (1990). *Development*, 110, 73-84.
- Lutz W, Stohr M, Schurmann J, Wenzel A, Lohr A and Schwab M. (1996). *Oncogene*, 13, 803-812.
- Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, Krasnokutsky S, Sartorelli V, Kedes L, Doglioni C, Beach DH and Hannon GJ. (1999). *Genes Dev*, 13, 2207-2217.
- Mironchik Y, Winnard PT, Jr., Vesuna F, Kato Y, Wildes F, Pathak AP, Kominsky S, Artemov D, Bhujwala Z, Van DP, Burger H, Glackin C and Raman V. (2005). *Cancer Res*, 65, 10801-10809.

- Nesbit CE, Tersak JM and Prochownik EV. (1999). *Oncogene*, 18, 3004-3016.
- Norris MD, Burkhardt CA, Marshall GM, Weiss WA and Haber M. (2000). *Med Pediatr Oncol*, 35, 585-589.
- Ohuchida K, Mizumoto K, Ohhashi S, Yamaguchi H, Konomi H, Nagai E, Yamaguchi K, Tsuneyoshi M and Tanaka M. (2007). *Int J Cancer*, 120, 1634-1640.
- Oliver TG, Grasset LL, Carroll AL, Kaiser C, Gillingham CL, Lin SM, Wickramasinghe R, Scott MP and Wechsler-Reya RJ. (2003). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 7331-7336.
- Schuldiner O and Benvenisty N. (2001). *Oncogene*, 20, 4984-4994.
- Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S, Garin E, Jallas AC, Combaret V, Krause A, Leissner P and Puisieux A. (2004). *Cancer Cell*, 6, 625-630.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A and Speleman F. (2002). *Genome Biol*, 3, RESEARCH0034.
- Vogan K, Bernstein M, Leclerc JM, Brisson L, Brossard J, Brodeur GM, Pelletier J and Gros P. (1993). *Cancer Res*, 53, 5269-5273.
- Wakamatsu Y, Watanabe Y, Nakamura H and Kondoh H. (1997). *Development*, 124, 1953-1962.
- Watanabe O, Imamura H, Shimizu T, Kinoshita J, Okabe T, Hirano A, Yoshimatsu K, Konno S, Aiba M and Ogawa K. (2004). *Anticancer Res*, 24, 3851-3856.
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A and Weinberg RA. (2004). *Cell*, 117, 927-939.

Figures legend

Figure 1: *MYC* and *TWIST* expression in colon and breast carcinomas

mRNA expression was assessed by quantitative real-time RT-PCR. Means and standard errors are shown. In the colon tumors (n = 10) (A) and in the breast tumors (n = 14) (B), there is no correlation between *MYCN* or *c-MYC* and *TWIST1*.

Figure 2: Overexpression of *MYCN* in NB cell lines

mRNA expression was assessed by quantitative real-time RT-PCR. Means and standard errors are shown. (A&B) Overexpression of *MYCN* or *c-MYC*, in SHEP cells, induces an increase of *TWIST1* and *ODC* expression. (C) Induction kinetics of *MYCN*. *MYCN* expression is induced in Tet21N cells. *ODC* and *TWIST1* expression are increased. *TWIST1* expression presents two peaks near 24-28h and after 72h.

Figure 3: Inhibition of *MYCN* expression in NB cell lines

mRNA expression was assessed by quantitative real-time RT-PCR. Means and standard errors are shown. (A) Inhibition of *MYCN* expression by interference RNA induces an increase of *c-MYC* expression but there is no significant effect over *TWIST1* and *ODC* expression. (B) Repression kinetics of *MYCN*. *MYCN* expression is inhibited by tetracycline treatment up to 96h. *TWIST1* expression is increased during all the kinetics. *ODC* expression is inhibited, except for t = 96h, where *ODC* expression is increased compared. *c-MYC* expression is first activated (16h), inhibited up to 88h, and then increased at 96h.

Figure 4: Supershift assays

Nuclear protein extracts are incubated with MycN or c-Myc antibody before the binding reactions with EMSA probes. The antibodies inhibited the binding of MycN and c-Myc on the probes. With (A) IGRN91 and (B) SHEP nuclear extracts, MycN and c-Myc proteins bind to the INR fragment of the *TWIST1* promoter. MycN and c-Myc proteins can also bind (C) to the E-box1 in SK-N-SH and (D) to the E-box2 in WAC cells.

Figure 5: *TWIST1* promoter and pGL3 constructs

Figure 6: Dual-luciferase assays with *TWIST1* promoter constructs

(A) *TWIST1* promoter fragments were cloned in pGL3-enhancer luciferase reporter.
(B) MycN proteins activate the 2E-box, 1E-boxAS and minimum constructs but not 1E-boxS. The constructs 1E-boxS and 1E-boxAS are activated by c-Myc. With MycN, 1E-boxASmut is less activated than the wild type whereas 1E-boxSmut is more activated than the wild type 1E-boxS. The two mutated construct are less activated by c-Myc than the wild type one.

Table 1: *MYCN* and *TWIST1* expression in NB tumors

MYCN and *TWIST1* mRNA expression were assessed by quantitative real-time RT-PCR in 124 tumors from the Gustave Roussy Institute (Paris, France). The table presents the stage mean expression of *MYCN* and *TWIST1* for each stage. The correlation between *MYCN* and *TWIST1* was analyzed by Pearson correlation test.

Figures

Figure 1

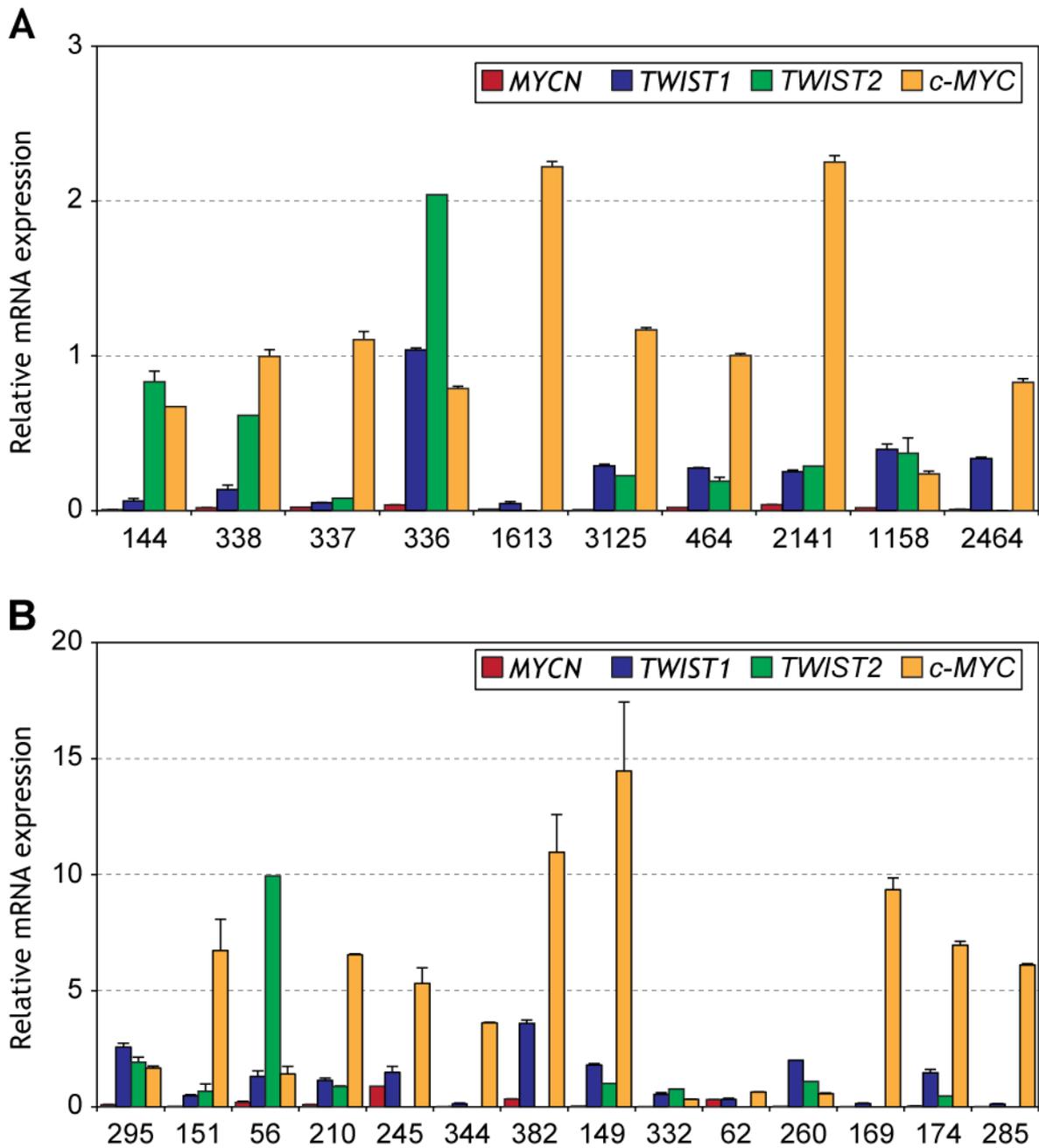


Figure 2

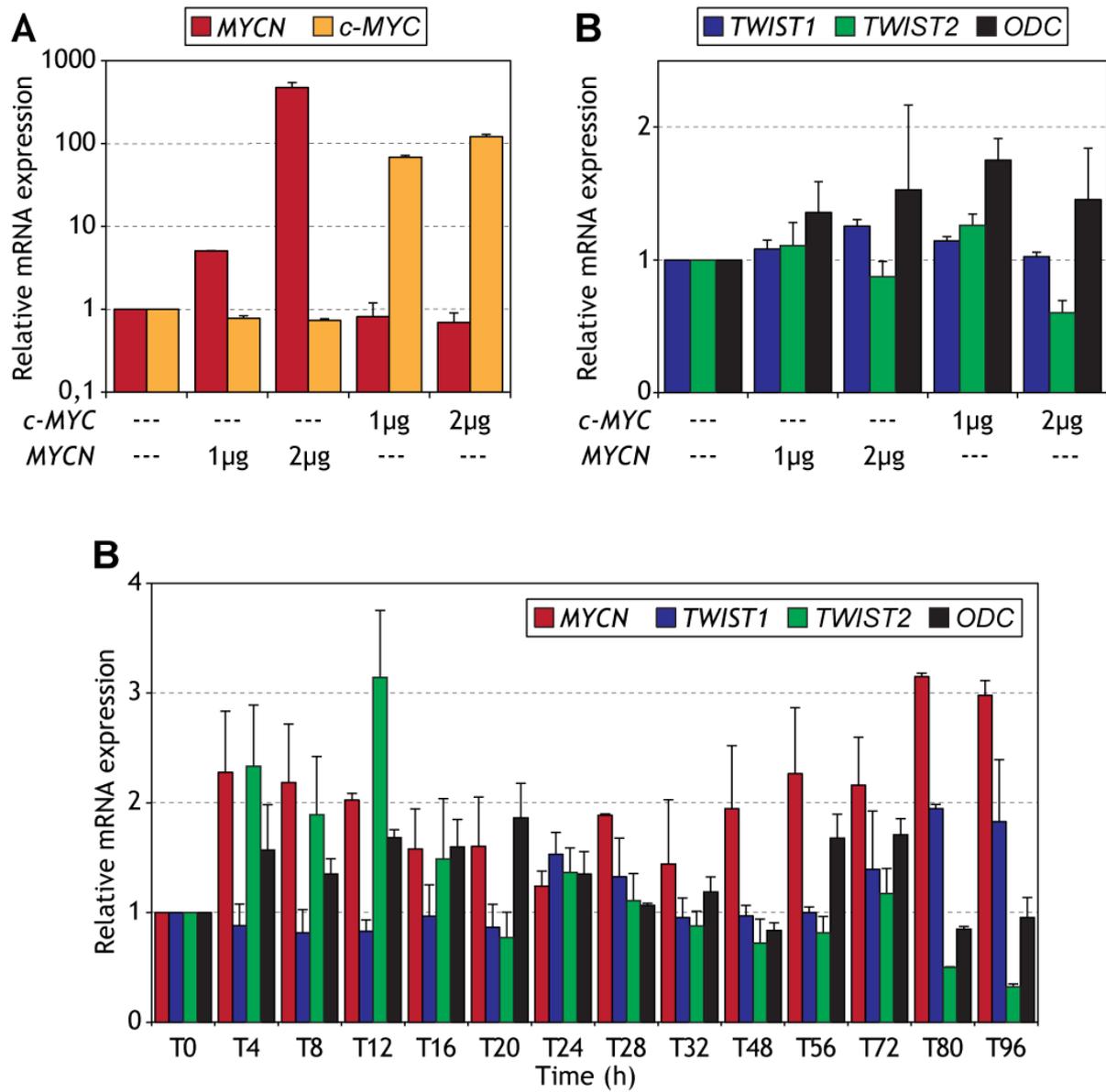


Figure 3

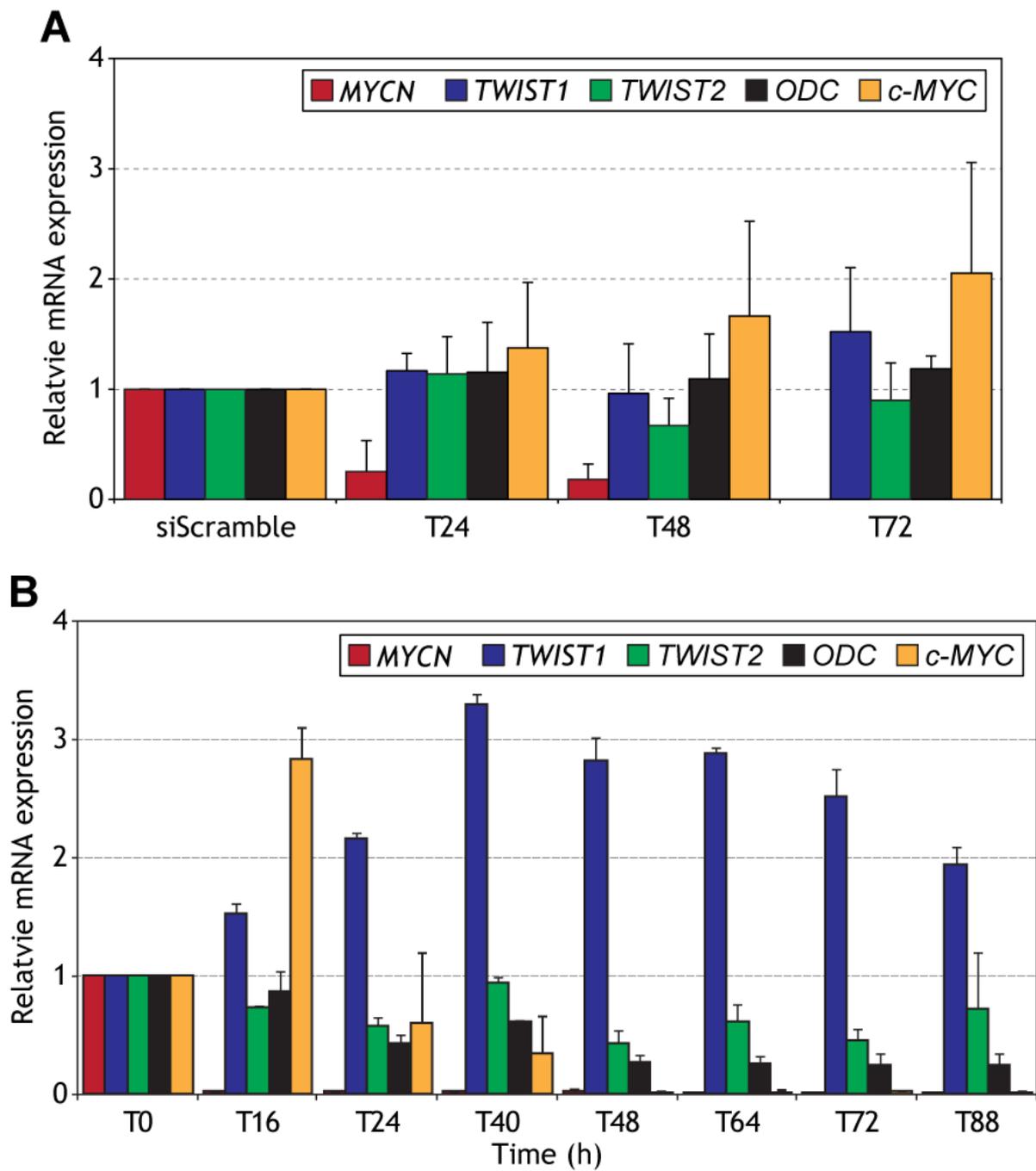


Figure 4

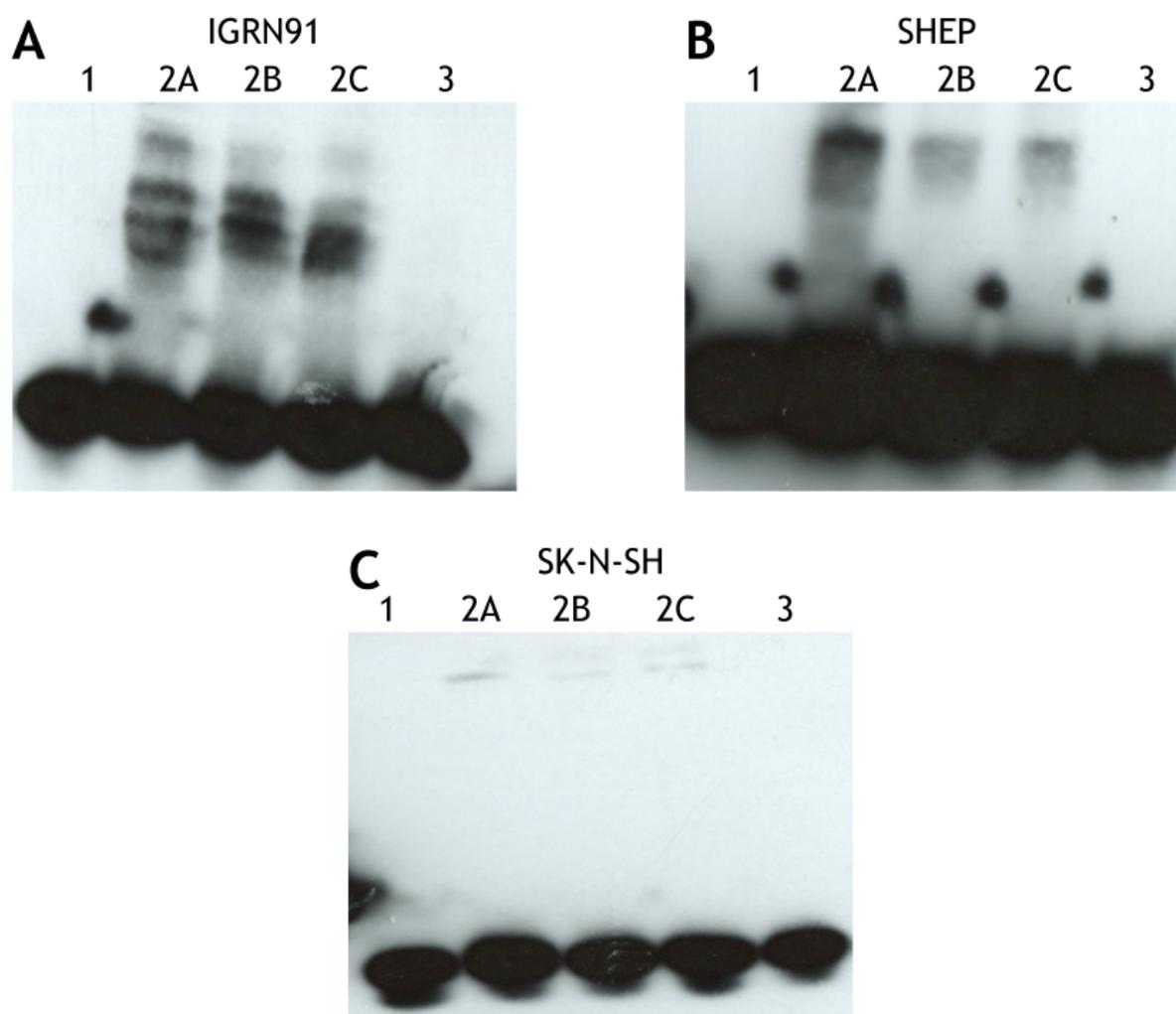


Figure 5

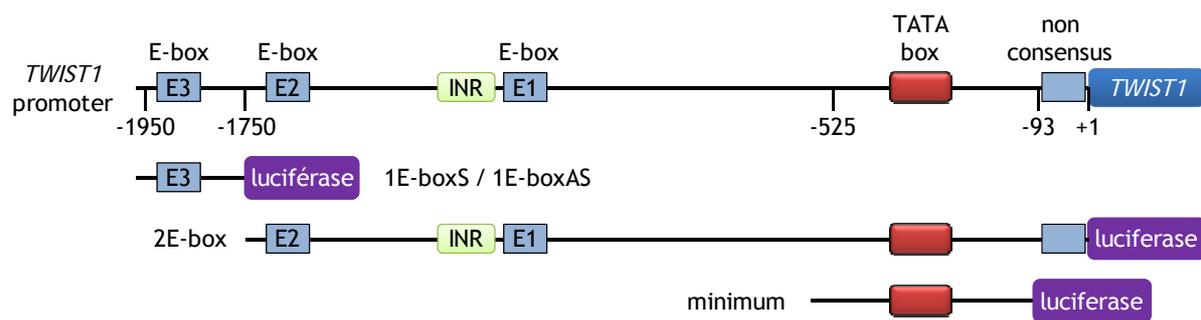


Figure 5

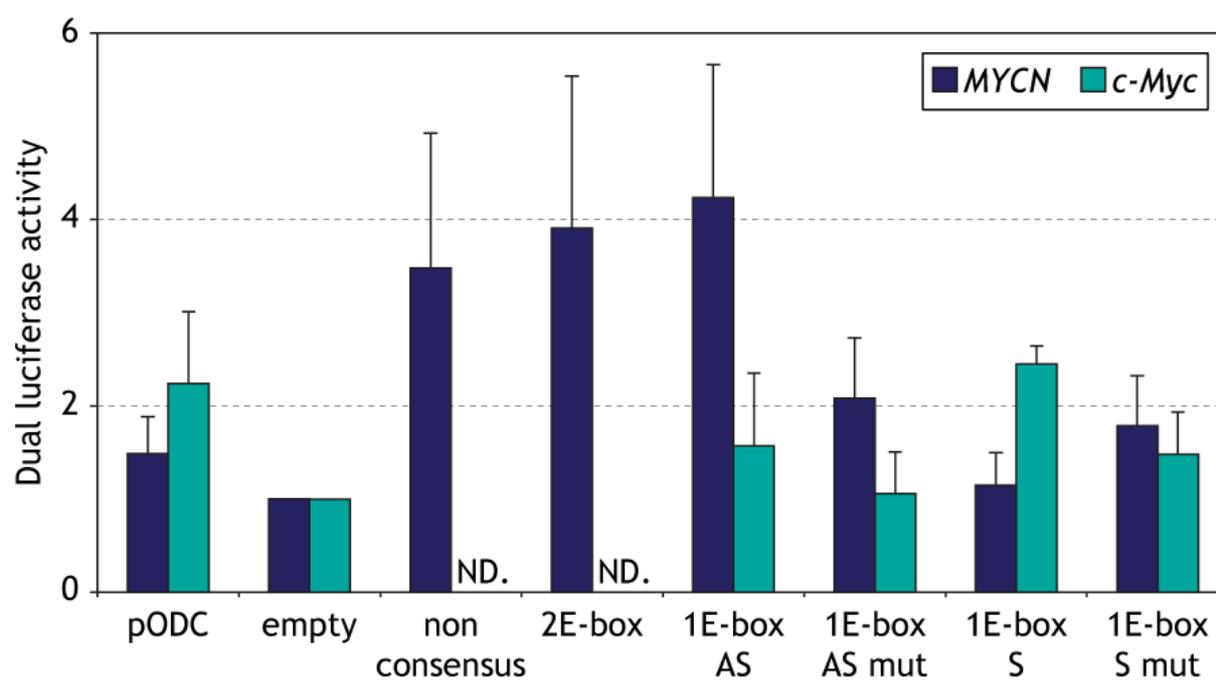


Table 1

stade	n =		
1	11		
2	13		
3	9		
4s	17		
4	74	pearson	p value
all	124	0.8067	<2.2E-16*

Publiée

Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, Fauvet F, Puisieux I, Doglioni C, Piccinin S, Maestro R, Voeltzel T, Selmi A, Valsesia-Wittmann S, Caron de Fromental C, Puisieux A. Induction of EMT by Twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. **Cancer Cell.** 2008

Induction of EMT by Twist Proteins as a Collateral Effect of Tumor-Promoting Inactivation of Premature Senescence

Stéphane Ansieau,¹ Jeremy Bastid,^{1,2,6} Agnès Doreau,^{1,6} Anne-Pierre Morel,^{3,6} Benjamin P. Bouchet,^{1,2} Clémence Thomas,^{1,2} Frédérique Fauvet,³ Isabelle Puisieux,¹ Claudio Doglioni,⁴ Sara Piccinin,⁵ Roberta Maestro,⁵ Thibault Voeltzel,¹ Abdelkader Selmi,^{1,2} Sandrine Valsesia-Wittmann,¹ Claude Caron de Fromental,¹ and Alain Puisieux^{1,2,3,*}

¹Inserm, U590, Lyon, F-69008, France

²Université de Lyon, Lyon 1, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lyon, F-69008, France

³Centre Léon Bérard, FNCLCC, Laboratoire de Recherche Translationnelle, Lyon, F-69008, France

⁴Belluno City Hospital, Belluno, I-32100, Italy

⁵CRO IRCCS, Aviano National Cancer Institute, Aviano, I-33081, Italy

⁶These authors contributed equally to this work

*Correspondence: puisieux@lyon.fnclcc.fr

DOI 10.1016/j.ccr.2008.06.005

SUMMARY

Twist1 and Twist2 are major regulators of embryogenesis. Twist1 has been shown to favor the metastatic dissemination of cancer cells through its ability to induce an epithelial-mesenchymal transition (EMT). Here, we show that a large fraction of human cancers overexpress Twist1 and/or Twist2. Both proteins override oncogene-induced premature senescence by abrogating key regulators of the p53- and Rb-dependent pathways. Twist1 and Twist2 cooperate with Ras to transform mouse embryonic fibroblasts. Interestingly, in epithelial cells, the oncogenic cooperation between Twist proteins and activated mitogenic oncoproteins, such as Ras or ErbB2, leads to complete EMT. These findings suggest an unanticipated direct link between early escape from failsafe programs and the acquisition of invasive features by cancer cells.

INTRODUCTION

Twist proteins are highly conserved basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors that have important regulatory functions during embryogenesis. In *Drosophila*, the ancestral Twist protein (named DTwist) is crucial for proper gastrulation and mesoderm formation (Simpson, 1983; Thisse et al., 1987). In mammals, two Twist-like proteins, Twist1 and Twist2, share high structural homology (Li et al., 1995; Wolf et al., 1991). Gene deletion experiments have shown that *Twist1* is required for closure of the neural tube during mouse development (Chen and Behringer, 1995), while *Twist2* knockout mice display elevated expression of proinflammatory cytokines causing perinatal

death (Sosic et al., 2003). Interestingly, this phenotype is also found in individuals doubly heterozygous for *Twist1* and *Twist2* alleles, reflecting some functional redundancy (Bialek et al., 2004). While Twist proteins are only expressed in a subset of mesodermally and ectodermally derived tissues, *Twist1* is overexpressed in various human solid tumors including numerous types of carcinomas as well as sarcomas, gliomas, neuroblastomas, and melanomas (Yang et al., 2004; Kwok et al., 2005; Mironchik et al., 2005; Zhang et al., 2007; Ohuchida et al., 2007; Entz-Werle et al., 2005; Elias et al., 2005; Valsesia-Wittmann et al., 2004; Hoek et al., 2004). The role of Twist1 in tumor progression has been convincingly associated with the metastatic process (Yang et al., 2004). Exogenous overexpression

SIGNIFICANCE

Because cells are frequently subjected to abnormal growth signals, multicellular organisms develop two major safeguard programs, senescence and apoptosis, that can eliminate potentially deleterious cells at early stages of tumor development. The mechanisms by which precancer cells escape these protective barriers remain to be determined. Herein, we identify Twist proteins as decisive early drivers of tumorigenesis. Indeed, Twist1 and Twist2 abrogated oncogene-induced senescence by inhibiting key regulators of this safeguard program. Strikingly, this deleterious effect was associated with complete epithelial-mesenchymal transition (EMT), a process associated with the acquisition of invasive potential. These observations suggest that some metastatic capabilities of cancer cells can be acquired during malignant conversion as a side effect of the inactivation of primary failsafe mechanisms.

of Twist1 increases the invasive and metastatic abilities of human cancer cells by promoting the downregulation of E-cadherin and the induction of an epithelial-mesenchymal transition (EMT) (Yang et al., 2004; Kwok et al., 2005; Mironchik et al., 2005). EMT, which was first recognized as a feature of embryogenesis, converts epithelial cells into mesenchymal cells and promotes cell motility through profound disruption of cell-cell junctions and extensive reorganization of the actin cytoskeleton (Hay, 1995).

The results presented herein indicate that *TWIST2*, similarly to *TWIST1*, is overexpressed in a large variety of human primary tumors and cancer cell lines. We next demonstrate that both Twist1 and Twist2 inhibit premature senescence in cancer cells, a process identified as an initial barrier to tumor development. Indeed, senescence occurs *in vivo* in precancerous lesions in response to aberrant mitogenic signaling, and its inactivation is required for progression toward malignancy (Chen et al., 2005; Michaloglou et al., 2005; Collado et al., 2005). We further show that this property allows Twist proteins to cooperate with mitogenic oncoproteins, resulting in full transformation of murine cells. Interestingly, in human epithelial cells, escape from premature senescence mediated by Twist1 or Twist2 is associated with complete EMT. Altogether, these findings suggest an as yet undescribed link between early escape from failsafe programs and acquisition of metastatic features.

RESULTS

Twist1 and Twist2 Override Oncogene-Induced Senescence in Murine and Human Cancer Cells

Twist1 has been shown to play a major role in breast cancer progression by promoting EMT and favoring the metastatic process (Yang et al., 2004). To further evaluate the role of both Twist proteins in carcinoma progression, we first took advantage of the MMTV-*ErbB2/Neu* transgenic mouse model (unactivated rat *ErbB2/Neu* gene under the transcriptional control of the mouse mammary tumor virus promoter/enhancer). *ERBB2* is a major oncogene involved in human breast tumorigenesis, and this mouse model is considered to be an appropriate tool for deciphering the molecular pathways involved in breast cancer progression. After a long latency, which is believed to represent the time required for mammary epithelial cells to acquire additional cooperative events, MMTV-*ErbB2/Neu* transgenic mice stochastically develop focal mammary tumors that can eventually metastasize to the lungs (Guy et al., 1992). Analysis of *TWIST1* and *TWIST2* expression in twenty independent spontaneous mammary tumors demonstrated a frequent activation of the *TWIST2* gene (Figure 1). Indeed, whereas *TWIST1* expression levels remained weak in all tumors, *TWIST2* was significantly upregulated ($p < 0.0001$) in 12 of them (60%), suggesting that Twist2 might be involved in tumor progression.

In an initial approach to define potential Twist2 oncogenic functions, cancer cell lines derived from either *TWIST2*-positive or -negative tumors from MMTV-*ErbB2/Neu* transgenic mice were established, and the consequences of *TWIST2* depletion by RNA interference were evaluated. Surprisingly, knockdown of *TWIST2* in *TWIST2*-expressing cell lines invariably triggered cellular senescence characterized by flattened cytoplasm, G1 growth arrest, senescence-associated β -galactosidase

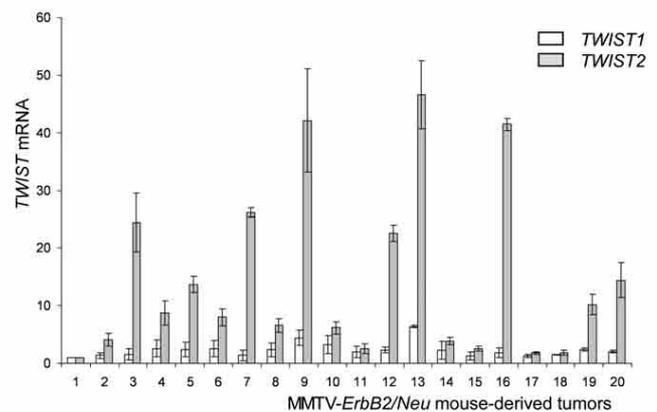


Figure 1. *TWIST2* Is Overexpressed in MMTV-*ErbB2/Neu*-Derived Mammary Tumors

TWIST1 and *TWIST2* gene expression in spontaneous tumors developed in MMTV-*ErbB2/Neu* transgenic mice as assessed by quantitative RT-PCR. Error bars represent mean \pm SD of triplicate experiments.

(SA- β -gal) activity, and induction of the de novo marker of cellular senescence *DEC1* (Qian et al., 2008; Collado et al., 2005) (Figure 2). Similar results were obtained using two independent *TWIST2* shRNA sequences. As expected, these two shRNAs had no effect on *TWIST2*-negative cell lines, thus demonstrating the specificity of the observation.

As aberrant activation of ErbB2 in mammary epithelial cells triggers a premature senescence response (Trost et al., 2005), our observations suggested that Twist2 induction might override oncogene-induced senescence *in vivo*. This property was not limited to murine cells. In fact, *TWIST2* but also *TWIST1* depletion promoted senescence in human melanoma and breast cancer cell lines (Figure 3), linking Twist1 and Twist2 to the inactivation of this failsafe program.

TWIST1 and *TWIST2* Are Frequently Overexpressed in Human Cancers

Whereas the overexpression of *TWIST1* has already been described in a large variety of tumors, the status of *TWIST2* in malignancies remains largely unknown. We thus measured *TWIST1* and *TWIST2* mRNA levels in a wide range of human tumors ($n = 148$) and human tumor-derived cell lines ($n = 64$) encompassing eight different cancer types (Figure 4A; see also Figure S1 available online). Overall, *TWIST1* and *TWIST2* were significantly upregulated in primary tumor cells ($p = 0.002$ and $p = 0.04$, respectively) and in cancer cell lines ($p < 0.0001$ and $p = 0.0042$, respectively) compared to their normal counterparts. As shown in Figure 4A, *TWIST1* and *TWIST2* overexpression was particularly frequent in melanoma samples. Melanomas are malignant proliferation of cutaneous melanocytes that can develop from benign nevi. Premature senescence is a major safeguard mechanism preventing the progression from nevi to melanomas (Michaloglou et al., 2005). Although generally harboring activating mutations in the B-Raf oncoprotein (a major effector of Ras), nevi typically remain in a growth-arrested state for decades. Peeper and collaborators have demonstrated that cells within nevi display characteristic features of senescence (including expression of p16^{Ink4a}) and are growth arrested, whereas in

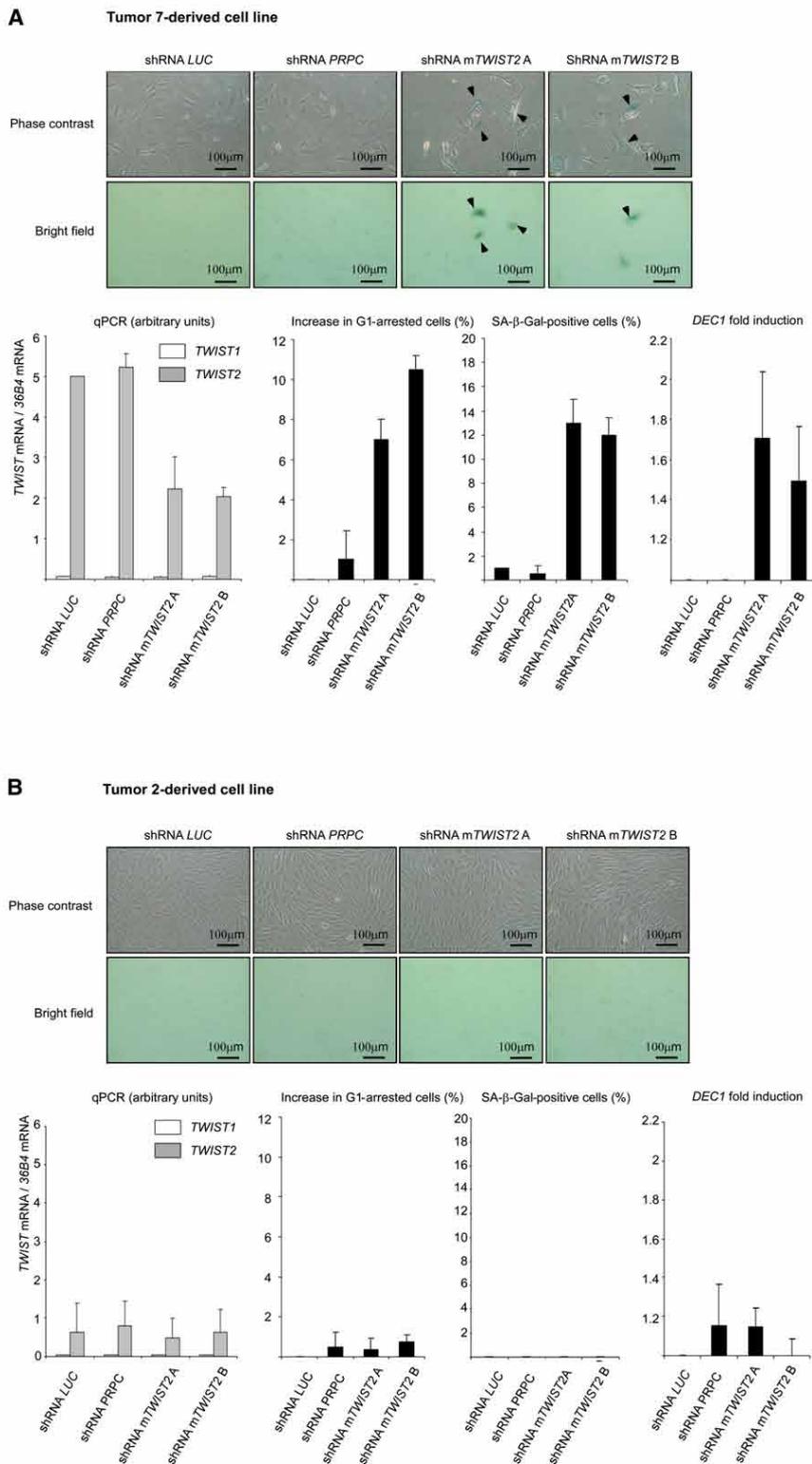


Figure 2. TWIST2 Depletion Induces Senescence in MMTV-ErbB2/Neu-Derived Tumor Cells

Cells derived from MMTV-ErbB2/Neu transgenic mouse tumors either overexpressing TWIST2 (tumor 7-derived cell line, [A]) or with no endogenous expression of TWIST2 (tumor 2-derived cell line, [B]) were transiently infected with retroviral constructs expressing either shRNAs directed against the murine TWIST2 gene (shRNA mTWIST2 A and shRNA mTWIST2 B) or shRNAs directed against the luciferase gene (shRNA LUC) or the prion pRcC protein (shRNA PRPC) as controls.

Upper panels: representative photomicrographs of cells obtained by phase-contrast microscopy and of SA-β-galactosidase staining observed in bright field.

Lower panels: TWIST1 and TWIST2 expression levels as assessed by real-time quantitative RT-PCR (qPCR; relative mRNA levels are indicated), % of increase in G1-arrested cells, % of SA-β-galactosidase (SA-β-Gal)-positive cells, and fold induction of the senescence marker DEC1 are shown. Error bars represent mean ± SD of triplicate experiments.

there is no reliable antibody against Twist2 currently available.) Strikingly, all nevi contained p16^{Ink4a}-expressing cells (50%–100% positive cells in 8 out of 12 cases), whereas no Twist1-expressing cells were observed. In contrast, high levels of Twist1 were detected in 5 out of 10 cases of melanoma. Consistent with a role of Twist1 in the inhibition of premature senescence, p16^{Ink4a} immunoreactivity was either undetectable or low in these samples, with an exclusive pattern when compared with Twist1 immunoreactivity (Figure 4B).

Twist1 and Twist2 Cooperate with Activated Ras for Malignant Transformation and Disrupt Both p53 and Rb Tumor Suppressor Pathways

The induction of premature senescence following constitutive activation of the Ras/Raf mitogenic pathway is particularly well documented (Serrano et al., 1997). To further study the biological effects of Twist1 and Twist2, standard cooperation assays were performed in primary murine embryonic fibroblasts (MEFs) using an activated form of H-Ras (H-Ras^{V12}). As expected, MEFs infected only with

melanoma, senescence is absent and cells proliferate (Michaloglou et al., 2005). Based on these observations, we evaluated Twist1 and p16^{Ink4a} expression using immunohistochemistry in a series of 12 melanocytic nevi and 10 melanomas. (Of note,

H-Ras^{V12} immediately stopped growing and underwent senescence characterized by flattened cytoplasm, induction of SA-β-gal activity, and G1 growth arrest (data not shown). In contrast, cells sequentially infected with H-Ras^{V12} and either Twist1

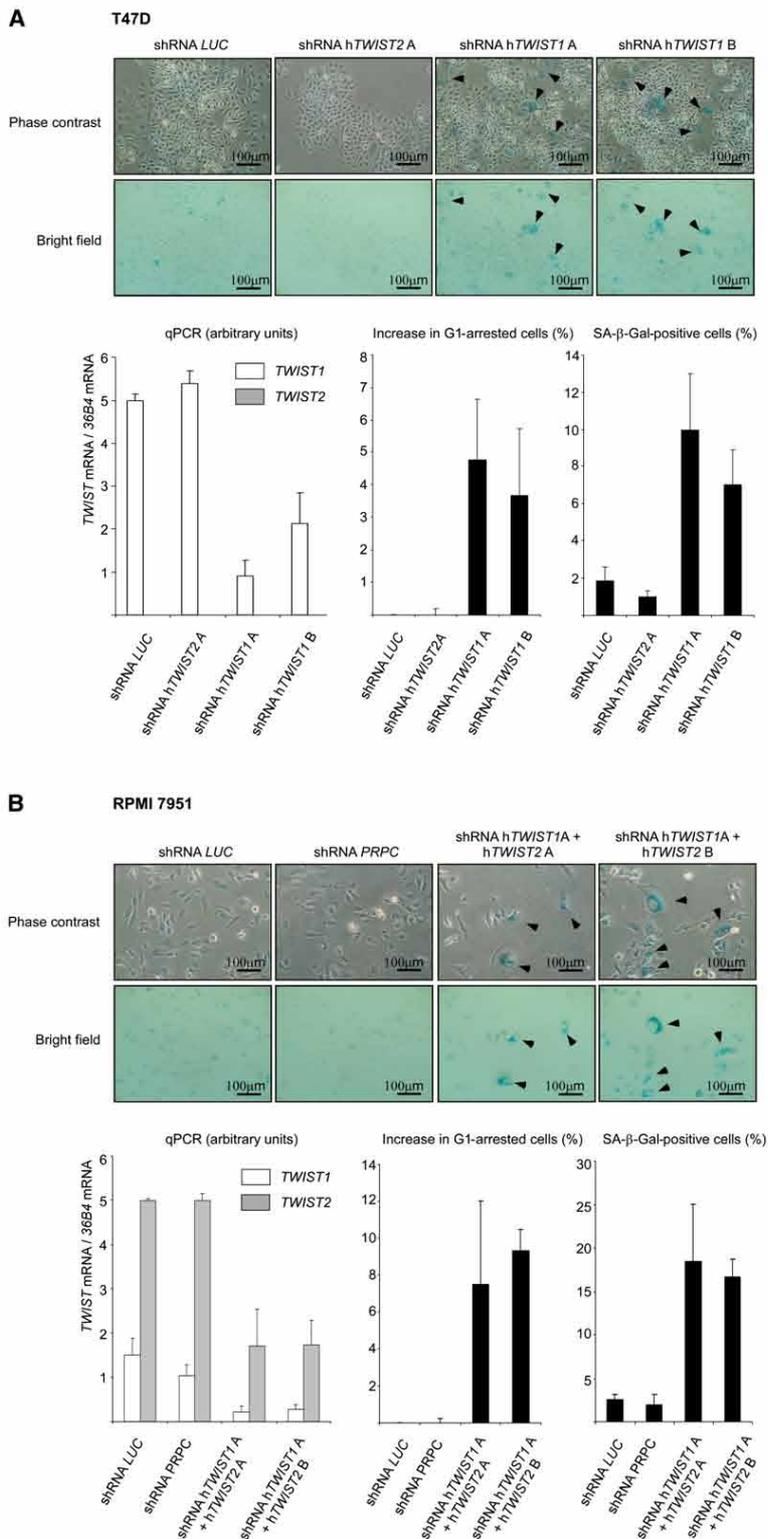


Figure 3. *TWIST1* and/or *TWIST2* Depletion Induces Senescence in Human Breast Cancer and Melanoma Cell Lines

T47D (human breast cancer cell line carrying four copies of *ERBB2*; [A]) and RPMI 7951 (human melanoma cell line carrying a mutant B-Raf^{V600E}; [B]) cells were doubly infected with lentiviral constructs expressing either shRNA directed against the human *TWIST1* (shRNA h*TWIST1* A and shRNA h*TWIST1* B) or *TWIST2* (shRNA h*TWIST2* A and shRNA h*TWIST2* B) genes as indicated or shRNAs directed against the luciferase gene (shRNA *LUC*) or the prion pR^{pC} protein (shRNA *PRPC*) as controls.

Upper panels: representative photomicrographs of cells obtained by phase-contrast microscopy and of SA-β-galactosidase staining observed in bright field.

Lower panels: *TWIST1* and *TWIST2* expression levels as assessed by real-time qPCR (relative mRNA levels are indicated), % of increase in G1-arrested cells, and % of SA-β-Gal-positive cells are shown. Error bars represent mean ± SD of triplicate experiments.

transformation such as loss of contact inhibition, growth in soft agar, and high tumorigenic potential as demonstrated after subcutaneous grafting into athymic *nude* mice (Figures 5B–5D; Figure S2). Although the time required for tumor growth varied slightly, clonogenic and tumorigenic capabilities were observed even in the presence of relatively low levels of ectopic Ras and/or Twist expression (data not shown). Upon histological examination, expanding xenografts displayed all of the features of aggressive sarcomas, with high levels of aberrant mitosis, anisokaryosis, and major angiogenic activity, further demonstrating a potent oncogenic cooperation between Twist proteins and Ras (Figure 5). Of note, although Twist proteins have been shown to regulate proinflammatory cytokine gene expression (Sosic et al., 2003), microarray analysis of MEFs and transformed MEFs did not show striking differences in expression of chemokines, interleukins, and their receptors (Table S1).

The p53 and Rb tumor suppressor pathways are known to play a pivotal role in the onset of premature senescence (Serrano et al., 1996). To further investigate the mechanisms by which Twist proteins inhibit oncogene-induced failsafe programs, we compared the endogenous expression of p16^{Ink4a}, ARF, p53, and p21^{Cip1} in MEFs infected with H-Ras^{V12} alone or in combination with Twist1 or Twist2 retroviral expression constructs. As shown in Figure 6A, Twist1 or Twist2 expression was sufficient to completely abrogate p16^{Ink4a} and p21^{Cip1} induction by activated Ras without downregulating ARF and p53 levels. Identical inhibitory effects were observed in cell lines either generated through the MEF transformation assays

or Twist2 continued proliferating (Figure 5A) and could be maintained in culture for months. MEFs overexpressing both H-Ras^{V12} and Twist1 or Twist2 exhibited hallmarks of malignant

(Ras + Twist1, Ras + Twist2) or derived from tumors induced in athymic *nude* mice (Figure 6A). To confirm that Twist per se was sufficient to abrogate p16^{Ink4a} and p21^{Cip1} activation, we

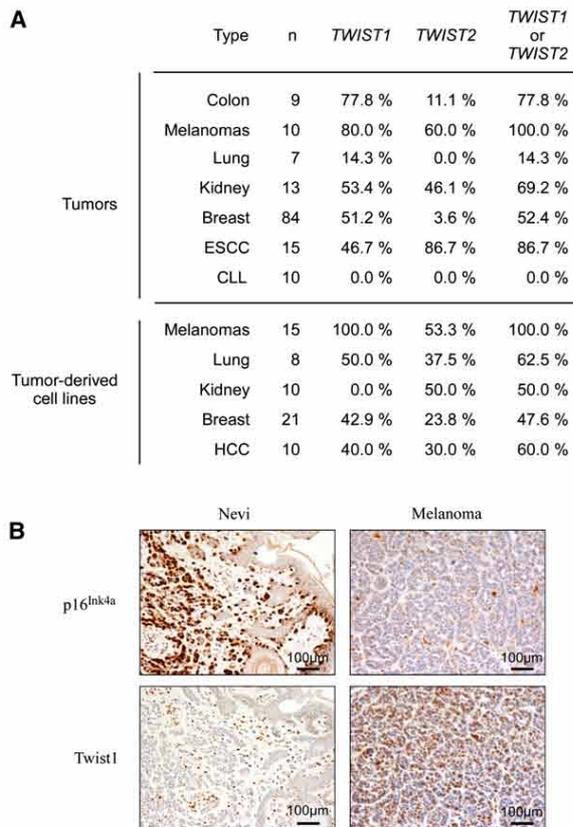


Figure 4. TWIST1 and TWIST2 Genes Are Overexpressed in Various Human Tumors and Tumor-Derived Cell Lines

(A) TWIST1 and TWIST2 gene expression was assessed by TaqMan real-time quantitative PCR analysis. Expression was compared with that of healthy tissue or normal cell counterparts. Percentages of samples harboring an overexpression of TWIST1 or TWIST2 genes (>2-fold) are shown. (More information is available in Figure S1 and the Supplemental Experimental Procedures.) ESCC, esophageal squamous cell carcinoma; CLL, chronic lymphoid leukemia; HCC, hepatocellular carcinoma.

(B) Immunohistochemical analysis of p16^{Ink4a} and Twist1 protein levels in human nevi and melanomas. Brownish dots detected in the cytoplasm of nevus cells are melanin granules. The dark brown cells in nevi are fibroblasts revealing that dermal fibroblasts are reactive for Twist1.

knocked down TWIST1 expression using RNA interference in Ras + Twist1-transformed MEFs. As shown in Figure 6B, inhibition of TWIST1 expression led to a significant reinduction of the expression of both cyclin-dependent kinase inhibitors. Nevertheless, this reinduction was not sufficient to trigger senescence, which might be due to residual ectopic Twist1. To gain insight into the mechanisms underlying the regulatory roles of Twist proteins, the effect of Twist1 and Twist2 on the p16^{Ink4A} and p21^{CIP1} genes was assessed in reporter assays. Consistent with the protein expression profile observed, Twist1 and Twist2 inhibited p16^{Ink4A} and p21^{CIP1} promoter activation by H-Ras^{V12} and p53 (Figures 6C and 6D). Although the molecular mechanisms involved in this effect are still under investigation, preliminary experiments suggest that the ability of Twist proteins to prevent the Ras-mediated activation of p16^{Ink4A} might be associated with their ability to interact with the Ras effector Ets2 (Figure S3).

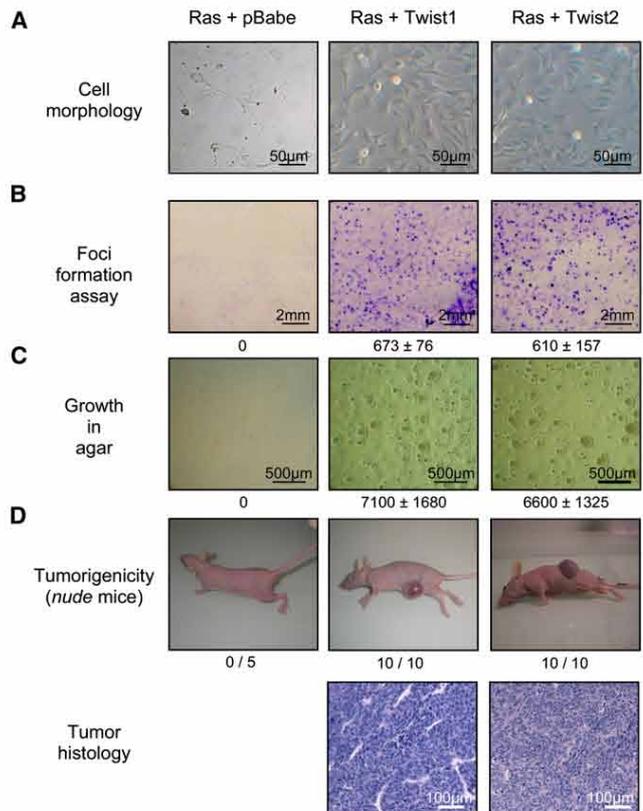


Figure 5. Twist Proteins Cooperate with Ras in MEF Transformation

Primary murine embryonic fibroblasts (MEFs) were sequentially infected with a retroviral vector encoding H-Ras^{V12} (Ras) and a retroviral vector encoding Twist1, Twist2, or an empty vector (pBabe) as a control.

(A) Ras-infected cells underwent senescence, whereas Ras + Twist-infected cells are immortalized.

(B) Foci formation assays indicating that Ras + Twist-infected MEFs have lost cell contact inhibition. Foci numbers (for 3×10^3 cells) \pm SD of triplicate experiments are indicated.

(C) Ras + Twist-infected MEFs grow on soft agar. Colony numbers (for 2×10^5 cells) \pm SD of triplicate experiments are indicated.

(D) MEFs infected with Ras alone or with Ras + Twist1 or Twist2 were subcutaneously grafted into irradiated Swiss nude mice. Ras + Twist-transformed MEFs are tumorigenic. The number of mice developing tumors is indicated. The tumors display characteristics of aggressiveness (including high mitotic index and high vascular density).

Twist1 and Twist2 Overcome Premature Senescence and Cooperate Further with Mitogenic Oncoproteins to Promote EMT and Invasiveness

The ability of Twist1 and Twist2 to overcome oncogene-induced senescence was confirmed in a variety of human cells including primary mammary epithelial cells (HMECs) (Figure 7), IMR90 and MRC5 diploid fibroblasts (Figure S4), and immortalized BJ primary fibroblasts expressing an inducible version of H-Ras^{V12} (data not shown). In all cases, expression of Twist1 or Twist2 completely abolished premature senescence induced by the activated mitogenic oncoprotein. We thereby confirmed that Twist1 or Twist2 overexpression was sufficient to override this crucial primary safeguard mechanism, thus providing a rationale for the observed oncogenic cooperation. Intriguingly, experiments with HMECs revealed a second level of cooperation. As

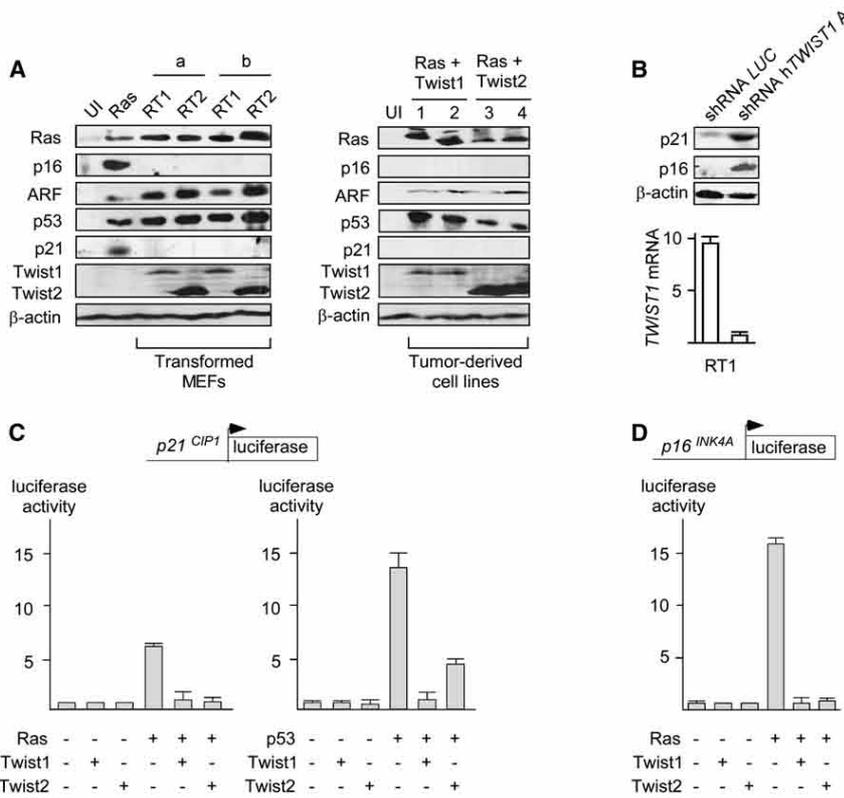


Figure 6. Effects of Twist1 and Twist2 Overexpression on Key Regulators of the p53 and Rb Signaling Pathways in Murine and Human Cells

(A) Western blots of cell lysates. Ras, p16^{INK4A}, ARF, p53, p21^{CIP1}, Twist1, and Twist2 protein levels are shown as indicated. Left panel: cell lysates from uninfected (UI) MEFs, MEFs transiently infected with a H-Ras^{V12} (Ras) retroviral expression construct, and transformation assay-derived cell lines coexpressing H-Ras^{V12} and Twist1 (RT1) or H-Ras^{V12} and Twist2 (RT2). "a" and "b" represent two independent infection experiments. Right panel: cell lysates from uninfected MEFs or from murine tumor-derived cell lines coexpressing H-Ras^{V12} and Twist1 or H-Ras^{V12} and Twist2 as indicated.

(B) Cell lysates from cell lines coexpressing H-Ras^{V12} and Twist1 infected with a shRNA directed against the *hTWIST1* gene (shRNA *hTWIST1 A*) or the *luciferase* gene (shRNA *LUC*). Inhibition of *hTWIST1*, as assessed by real-time qPCR (relative mRNA levels are shown), is associated with the restoration of p16^{INK4A} and p21^{CIP1} protein expression.

(C and D) Twist1 and Twist2 act as transcriptional repressors of both *p16^{INK4A}* and *p21^{CIP1}* genes. E1A-immortalized MEFs were transiently cotransfected with H-Ras^{V12}, p53, Twist1, and Twist2 expression constructs as indicated, along with the human *p21^{CIP1}* (C) and *p16^{INK4A}* (D) promoters. Relative luciferase activity is shown. Error bars represent mean ± SD of triplicate experiments.

shown in earlier studies (Yang et al., 2004), ectopic expression of Twist1 alone in HMECs triggered several features of EMT (Figure 7). However, Twist1-mediated EMT was only partial as demonstrated by the observed cellular morphology, the significant but incomplete decrease of the E-cadherin epithelial marker, and the modest increase of the vimentin mesenchymal marker (Figures 7A and 7B). Of note, a similar effect was also observed with Twist2. In contrast, expression of both Twist1 (or Twist2) and H-Ras^{V12} (or ErbB2) triggered a total loss of E-cadherin, an increase in vimentin expression (Figure 7 and data not shown), and a concomitant acquisition of invasive properties (Figure 7C). A cooperative effect between Twist and mitogenic oncoproteins on the acquisition of mesenchymal features and invasive properties was also observed in Ras-transformed mammary epithelial MCF10A cells (MCF10A cells retrovirally infected by Ras^{V12}, MCF10A pLX Ras^{V12}) (Figure S5) (Konishi et al., 2007).

Because the role of Twist1 in the induction of EMT was originally demonstrated in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells (Yang et al., 2004), we next examined the effects of Twist1 or Twist2 in the presence or absence of H-Ras^{V12} in these cells. In line with previous observations, overexpression of Twist1 or Twist2 alone was sufficient to trigger some morphological features of EMT, including a fibroblastic morphology, associated with a significant decrease of epithelial markers and increase of mesenchymal protein levels. Nevertheless, as demonstrated by the additional reduction of epithelial markers and further increase of mesenchymal protein expression, complete EMT required the presence of H-Ras^{V12}, confirm-

ing the cooperative effect (Figure 8). The mechanisms underlying this observation remain unknown. EMT is regulated by an elaborate interplay of signaling pathways. However, it is noteworthy that oncogenic Ras has been shown to cooperate with TGF-β to induce EMT (Oft et al., 1996) and that TGF-β is believed to act through the induction of several transcription repressors, including Twist1 (Kang and Massague, 2004).

Taken together, our results highlight an unexpected double-barreled oncogenic cooperation between Twist proteins and mitogenic oncoproteins such as Ras and ErbB2. On one hand, Twist1 or Twist2 allows cancer cells to override premature senescence, and on the other hand, concomitant activation of Twist and mitogenic signaling promotes complete EMT, thereby facilitating invasion and metastasis.

DISCUSSION

Aberrant cell proliferation and malignant transformation induced by some oncogenes are restrained by cellular senescence (Serrano et al., 1997). First considered as a cell culture artifact, premature senescence was recently confirmed in vivo as an early barrier against tumor progression (Bartkova et al., 2005; Chen et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005; Collado et al., 2005). Indeed, it occurs in many different precancerous tissues in both humans and mice but is absent in malignant tumors, suggesting that its inactivation is a general requirement for full-blown cancer progression. However, the mechanisms allowing pre-malignant cells to bypass this primary failsafe program remain

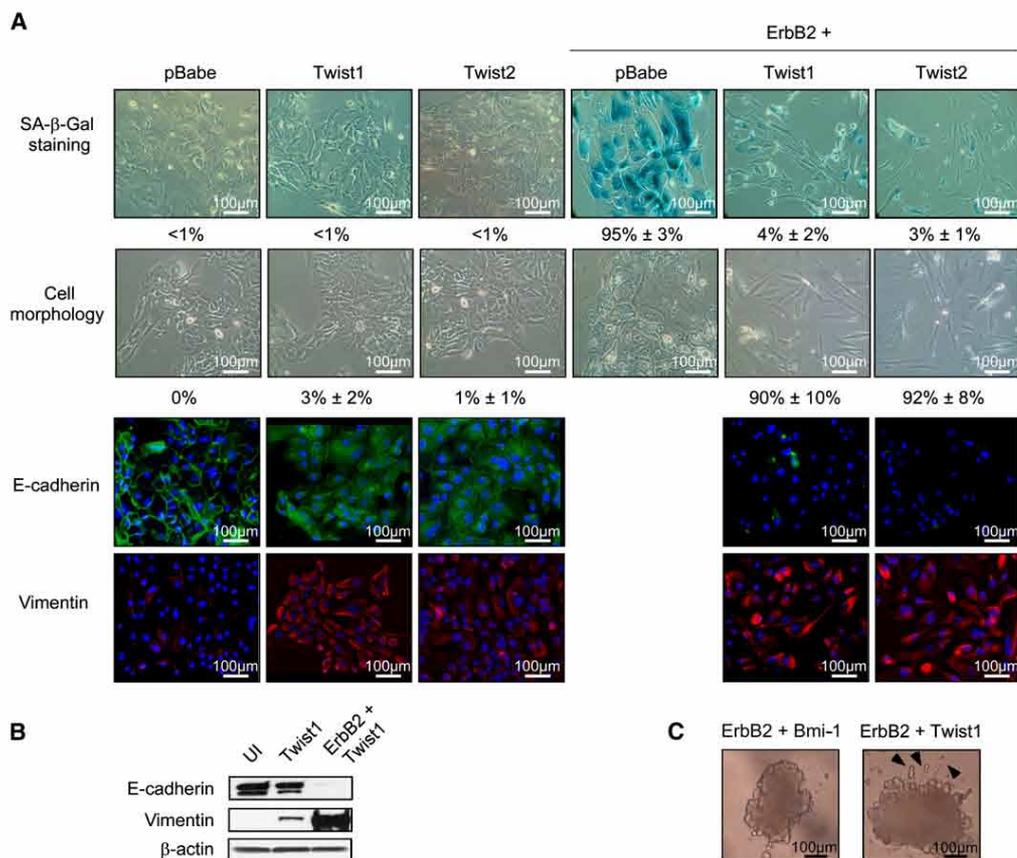


Figure 7. Twist-Dependent Failsafe Program Escape in Human Mammary Epithelial Cells Is Associated with Complete EMT and Acquisition of Invasive Properties

(A) Human mammary epithelial cells (HMECs) were infected with Twist1 or Twist2 retroviral expression constructs (left three columns) or sequentially infected with ErbB2 and Twist1 or Twist2 retroviral expression constructs (right three columns) as indicated. First row: representative photomicrographs of SA- β -Gal staining. Percentages of SA- β -Gal-positive cells (\pm SD of triplicate experiments) are indicated. Second row: phase-contrast microscopy showing cell morphology. Percentages of fibroblastic cells (\pm SD of triplicate experiments) are indicated. Third and fourth rows: E-cadherin (epithelial marker) and vimentin (mesenchymal marker) expression analysis by immunofluorescence. Nuclei were counterstained using Hoechst.

(B) Expression of E-cadherin and vimentin proteins in the same cells was analyzed by western blotting.

(C) Comparison by Matrigel invasion assay of the invasive properties of HMEC cells sequentially infected with ErbB2 and either Bmi-1 or Twist1 retroviral expression constructs as indicated. Bmi-1 was used as a control due to its ability to override oncogene-induced senescence.

largely unknown. Our results show that Twist1 and Twist2, two important regulators of embryogenesis, are frequently activated in human cancer cells and that their induction is sufficient to override oncogene-induced senescence in both murine and human cells by inhibiting both the p53 and Rb tumor suppressor pathways. In line with these observations, Twist proteins cooperate with Ras to transform MEFs, further demonstrating their oncogenic properties. At least in vitro, the Twist1 and Twist2 oncogenic activities appear to rely largely upon the inhibition of premature senescence. Indeed, in conditions where Ras activation does not trigger senescence, e.g. targeted knockin of a mutant *K-Ras* gene in immortalized MCF10A breast cells, no Twist-dependent transforming activity as assessed by soft agar assay (Figure S6) could be observed. Of note, MCF10A is a nontumorigenic but immortal HMEC cell line displaying a rearrangement and a deletion affecting the *INK4/ARF* locus that lead to a homozygous loss of the *p16^{INK4A}*, *ARF*, and *p15^{INK4B}* genes (Cowell et al., 2005).

The role of Twist proteins in the inhibition of premature senescence is concordant with previous studies that reported the induction of Twist1 expression during the progression toward malignant stages in several cancer types including prostate, bladder, and pancreatic lesions (Kwok et al., 2005; Zhang et al., 2007; Ohuchida et al., 2007). The inverse correlation between *p16^{INK4A}* and Twist1 protein levels in nevi and melanoma samples also supports the role of Twist proteins as negative modulators of *p16^{INK4A}* and as crucial inhibitors of oncogene-induced senescence in human cancer cells. As we have previously demonstrated that Twist1 and Twist2 are able to inhibit Myc-induced apoptosis in vitro and in vivo (Maestro et al., 1999; Valsesia-Wittmann et al., 2004), Twist proteins appear to act as general inhibitors of oncogene-induced safeguard programs. Noticeably, in response to activated Ras, Twist1 and Twist2 appear to act by downregulating the cyclin-dependent kinase inhibitors *p16^{INK4A}* and *p21^{Cip1}* without affecting ARF levels, whereas ARF is a crucial Twist target in response to aberrant

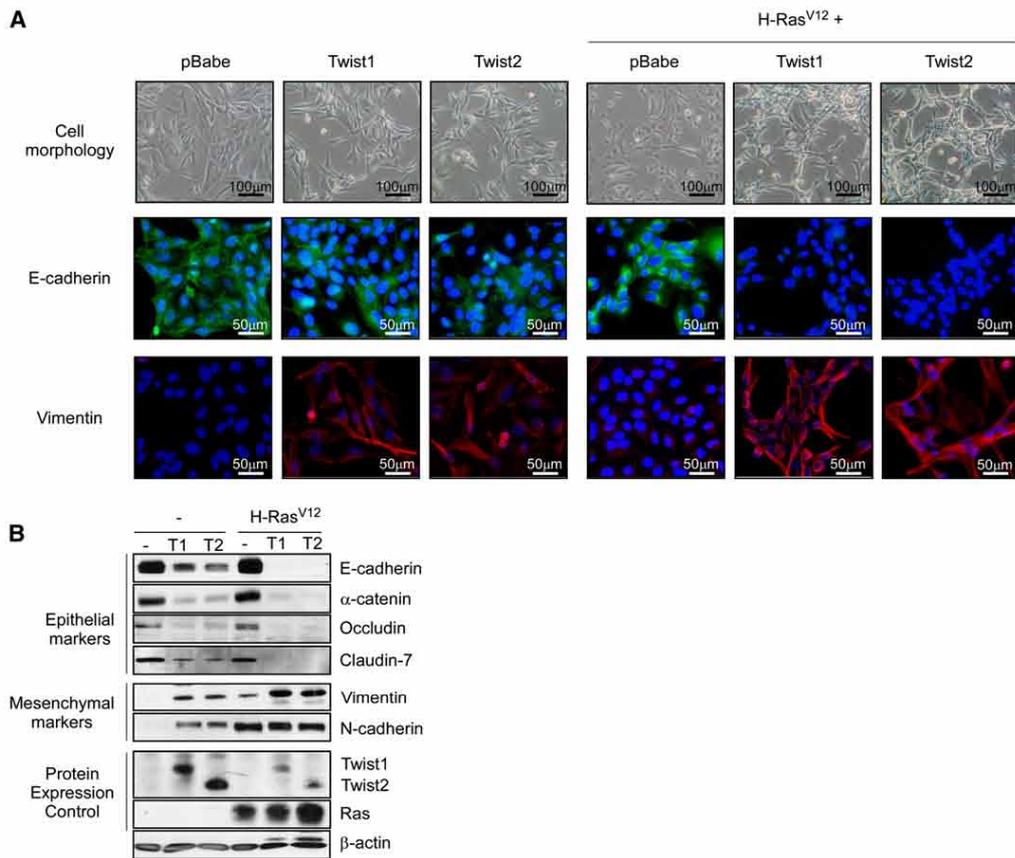


Figure 8. Twist Proteins Cooperate with Ras to Induce Complete EMT in MDCK Cells

Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells were infected with Twist1 or Twist2 retroviral expression constructs (left three columns) or sequentially infected with H-Ras^{V12} and Twist1 or Twist2 retroviral expression constructs (right three columns) as indicated.

(A) First row: representative photomicrographs of cells obtained by phase-contrast microscopy. Second and third rows: E-cadherin and vimentin expression analysis by immunofluorescence. Nuclei were counterstained with Hoechst.

(B) Expression analysis of epithelial and mesenchymal markers, Twist1, Twist2, and Ras proteins by western blotting.

Myc activation (Maestro et al., 1999; Valsesia-Wittmann et al., 2004). Although the underlying mechanisms remain to be determined, the differential effect on *ARF* gene expression has been confirmed in reporter assays (data not shown).

Escape from oncogene-induced senescence and apoptosis being a general prerequisite for malignant conversion, our observations suggest that Twist1 and Twist2 are early drivers of tumor progression and provide a rationale for the high frequency of *Twist1* and *Twist2* overexpression in a large variety of human tumors. Furthermore, these findings shed new light on the role of Twist proteins in EMT and metastasis. Several groups have previously reported that high Twist1 expression promotes EMT and correlates with tumor invasion and metastasis in a variety of human cancers (Yang et al., 2004; Mironchik et al., 2005; Kang and Massague, 2004). Overall, our data show that in cells with aberrant mitogenic signaling, Twist1 or Twist2 reactivation overrides primary safeguard mechanisms to trigger cell transformation and, as a side effect, promotes EMT in cooperation with mitogenic oncoproteins, favoring invasiveness. In conditions where the mitogenic activation does not trigger senescence (due either to low levels

of oncoprotein or to alternative mechanisms leading to a deregulation of safeguard programs), Twist1 and Twist2 do not display major transforming capabilities but still cooperate with activated oncoproteins in promoting EMT (Figures S5 and S6).

A prevailing model proposes that transcription factors involved in EMT promotion, such as Twist1, Snail, and Slug, are induced in rare cancer cells residing at the invasive edge of advanced carcinomas in response to signals released by the activated stroma (Scheel et al., 2007). According to this model, *Twist1* induction will not provide any growth advantage within the primary tumor and will specifically favor cell dissemination, particularly the steps of motility and invasiveness. Based on our observations, we propose an alternative model in which, in the presence of aberrant mitogenic signaling, reactivation of the developmental proteins Twist1 and Twist2 promotes the transition from a premalignant to a malignant stage by inactivation of innate failsafe programs. Due to the cooperative effect of Twist1 or Twist2 and mitogenic factors on EMT promotion, this model predicts that most of the cancer cells within the primary tumor will be responsive to EMT-inducing signals from

the microenvironment, highly increasing the risk of metastatic dissemination.

Challenging the classical view of metastasis as the final step of tumor progression, recent observations further support the notion that early transformed cells are capable of dissemination. Specifically, Klein and colleagues have reported that disseminated cancer cells in the bone marrow of breast cancer patients exhibit different and fewer alterations than their matched primary tumors (Schmidt-Kittler et al., 2003; Schardt et al., 2005). By using BALB/c mice transgenic for the activated rat *ErbB2/Neu* gene, the same group recently demonstrated that dissemination of epithelial cells begins shortly after expression of the oncogenic transgene, as early as the stage of atypical hyperplastic lesion (Husemann et al., 2008). Strikingly, unlike both normal mammary glands and the invasion front of advanced tumors, these early lesions are characterized by a significant overexpression of *TWIST1* (of note, *TWIST2* expression was not examined by these authors). Although further work is warranted to confirm these observations in human cancers, these and our findings support the hypothesis that reactivation of Twist proteins in vivo promotes malignant conversion concomitantly with metastatic dissemination.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Constructs

N-terminally FLAG-tagged human Twist1, Twist2, and H-Ras^{V12} proteins were expressed from the pBabe, pCI-neo, or pcDNA3 expression vectors (Promega). The human *ERBB2* cDNA was subcloned into the pBabe retroviral expression vector.

Human *ARF*, *p16^{Ink4A}*, and *p21^{Cip1}* luciferase reporter constructs have been described previously (Linggi et al., 2002; Hara et al., 1996; el-Deiry et al., 1993). The H-Ras^{V12} pBabe and the Bmi-1 pBabe expression constructs were generous gifts from the laboratories of Robert A. Weinberg and Goberdhan P. Dimri.

shRNAs directed against the human *TWIST1* gene (shRNA h*TWIST1* A, 5'-GCTGAGCAAGATTTCAGACC-3' [Yang et al., 2004]; shRNA h*TWIST1* B, 5'-GTACATCGACTTCCTCTAC-3'), the human *TWIST2* gene (shRNA h*TWIST2* A, 5'-GCAAGAAGTCGAGCGAAGA-3'; shRNA h*TWIST2* B, 5'-GCTGAGCAAGATCCAGACG-3'), and the murine *TWIST2* gene (shRNA m*TWIST2* A, 5'-GCAAGAAATCGAGCGAAGA-3'; shRNA m*TWIST2* B, 5'-GCTCAGCAAGATCAGACG-3') and control shRNAs directed against the luciferase GL3 gene (shRNA *LUC*, 5'-CTTACGCTGAGTACTTCA-3') and the prion pRnC protein (shRNA *PRPC*, 5'-TGAGCAGGCCCATCATACA-3') were subcloned into the pRETRO-SUPER and the lentiviral pLVTHM expression vectors.

Cell Culture and Retroviral Infection

Primary MEFs (derived from C57BL/6 × DBA2 F1 mice), E1A-immortalized MEFs, transformed MEF cell lines, and tumor-derived cell lines were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 1 mM HEPES (GIBCO), and 0.1 mM nonessential amino acids. RPMI 7951, T47D, MDCK, MCF10A, and HMEC cell lines were grown as recommended by the American Type Culture Collection (ATCC).

Pit-E and Pit-A producer cells were used to generate retroviral stocks. 3 × 10⁶ Pit-E (-A) cells were transfected by calcium phosphate precipitation with 10 μg of retroviral vector and then placed after 24 hr in 5 ml of fresh medium for viral production. Forty-eight hours after transfection, the supernatant was collected, filtered (0.45 μm, Millipore), and supplemented with 4 μg/ml of polybrene (Sigma). The viral stock was placed in contact with 1 × 10⁶ MEFs (or 2.5 × 10⁵ human cells) for 3 hr, and infected cells were selected after 24 hr with appropriate antibiotics. Cooperation assays were performed by sequential infections using Ras- or ErbB2-expressing constructs and Twist1, Twist2, or empty (pBabe) expression constructs, spaced by a 48 hr period of time. Foci formation and growth on agar were assessed as described in Petrenko et al. (2003). *TWIST1* and/or *TWIST2* depletion experiments were performed

by a double 48 hr-spaced infection of cells with retroviral or lentiviral shRNA expression virus using Pit-E or 293T cells as packaging cell lines.

Real-Time qRT-PCR

SYBR green quantitative PCR (Figure 1, Figure 2, Figure 3, and Figure 6) was performed using *36B4* as an internal control gene. Trans-species primer pairs were 5'-GACAGACGTGTCAGCTC-3' and 5'-CTGGCTTCTCCTCGCTGTT-3' for *TWIST1*, 5'-GCAAGAAGTCGAGCGAAGAT-3' and 5'-GCTCTGCA GCTCCTCGAA-3' for *TWIST2*, 5'-GGCGGGGAATAAACGGAGCGA-3' and 5'-CCTCACGGGCACAAGTCTGGAA-3' for *DEC1* (Collado et al., 2005), and 5'-GCTGATGGGCAAGAACACCA-3' and 5'-CCGGATGTGAGGCGCA GTT-3' for *36B4*.

The TaqMan quantitative PCR method used to analyze *TWIST* expression in human primary tumors and tumor-derived cell lines is described in detail in the Supplemental Experimental Procedures.

Human Tumor Samples

Human tissue samples were obtained from the Centre de Ressources Biologiques (Centre Léon Bérard, French agreement number DC-2008-99) after approval by the Comité de Protection des Personnes Lyon Est and by the institutional review board and ethics committee of Centre Léon Bérard, with fully informed patient consent.

Reporter Assays

3 × 10⁵ E1A-immortalized MEFs were cotransfected with 1.5 μg of reporter construct, 0.5 μg of expression vector, and 0.3 μg of internal pRL-TK-luc construct (Promega) using jetPEI transfectant (Qiagen). Twenty-four hours after transfection, luciferase activity was monitored using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) and a luminometer (Luminoskan Ascent, Labsystem).

Mouse Xenografts

Animal maintenance and experiments were carried out in accordance with the animal care guidelines of the European Union and with French laws and were validated by the Comité Régional d'Éthique Animale CNRS Rhône-Alpes. Six-week-old female athymic Swiss nude mice (Charles River Laboratories) were subcutaneously grafted in the left flank with 1 × 10⁵ Ras + Twist1 or Twist2 retrovirally infected MEFs. Tumor growth was monitored twice a week with calipers at the site of injection. Animals were allowed to form tumors up to 1.5 cm in diameter, at which point they were euthanized. Each tumor was dissected and either fixed in formaldehyde and processed for histopathologic examination or used for protein or RNA extraction.

Immunoblot Analysis

Cell lysates were prepared in RIPA buffer. Protein expression was examined by western blotting using rabbit anti-mouse p16^{Ink4a} M-156 and anti-human p16^{Ink4a} H-156 (Tebu-bio), anti-mouse p21^{Cip1} C-19 (Tebu-bio), anti-Ras C-20 (Tebu-bio), anti-mouse ARF Ab80 (Abcam), anti-human ARF Ab1 (Neo-Markers), anti-mouse p53 CM5 (Novocastra), and anti-Claudin-7 (Zymed) polyclonal antibodies and mouse anti-human p21^{Cip1} SX118 (Dako), anti-β-actin AC15 (Sigma), anti-FLAG M2 (Stratagene), anti-E-cadherin, anti-N-cadherin, anti-α-catenin, anti-ZO-1 (BD Biosciences), anti-vimentin V9 (Dako), and anti-occludin (Zymed) monoclonal antibodies for primary detection. Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit or sheep anti-mouse antibodies (Amersham) were used as secondary antibodies. Western blots were revealed using an ECL Detection Kit (Amersham).

Characterization of Senescent Cells

SA-β-Galactosidase Staining

Cells were fixed in 3% formaldehyde, washed three times with PBS, and incubated at 37°C for 12 hr in buffer containing 40 mM sodium phosphate (pH 6), 5 mM K₄Fe(CN)₆, 5 mM K₃Fe(CN)₆, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, and 1 mg/ml X-Gal.

Flow Cytometry Analysis

Trypsinized cells were washed in PBS, fixed in cold 70% ethanol/PBS for 30 min, washed, and incubated for 1 hr in 1 ml PBS containing 0.1 mg/ml RNase A and 20 mg/ml propidium iodide. Cell-cycle profiles were then

determined using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences), and data were analyzed using CellQuest software.

Immunofluorescence Analysis

Cells were seeded onto glass coverslips 24 hr prior to treatments. Cells were fixed with 4% formaldehyde for 10 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 20 min at room temperature, saturated for 30 min with 10% FCS in PBS, washed in PBS, incubated overnight at 4°C with monoclonal anti-E-cadherin (BD Biosciences) or anti-vimentin V9 (Dako) antibodies, and then incubated for 1 hr with FITC- or TRITC-conjugated rabbit anti-mouse antibodies (Dako). Cells were counterstained with 2 µg/ml Hoechst (33258, Sigma). Coverslips were then mounted with Fluoromount-G (Southern Biotech).

Immunohistochemistry

Routine formalin-fixed and paraffin-embedded excision biopsies of a series of melanocytic neoplasms (including 12 nevi and 10 melanomas) were analyzed. Immunohistochemistry was performed on 5 µm tissue sections. All specimens were immunostained with a non-biotin detection system (Bond Polymer Refine, Leica Microsystems), with diaminobenzidine development. Heat-induced antigen retrieval was performed using Tris-EDTA buffer (pH 9.0) in a water bath at 95°C for 30 min. Monoclonal anti-p16^{Ink4a} (clone JC8, NeoMarkers) and anti-Twist1 (clone Twist2C1a, Biomatix) antibodies were used. Stainings were performed with an automatic immunostainer (Bond System, Leica Microsystems).

Matrigel Invasion Assays

Matrigel (BD Biosciences) was added to the wells of an eight-well Labtek chamber in a volume of 300 µl/well. A Matrigel plug of about 1 mm diameter was removed. The hole was successively filled with 1×10^5 cells and 100 µl of Matrigel. Appropriate growth medium was added on top. Cultures were analyzed for up to 4 days. Areas of migration were visualized using an Olympus X50 (NA 0.075). Samples were performed in duplicate.

ACCESSION NUMBERS

Microarray data have been entered into the NCBI Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with the accession number GSE11756.

SUPPLEMENTAL DATA

The Supplemental Data include Supplemental Experimental Procedures, Supplemental References, six figures, and one table and can be found with this article online at <http://www.cancer-cell.org/cgi/content/full/14/1/79/DC1/>.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Isabelle Treilleux and Jean-Philippe Michot (Anatomy-Cytopathology Unit, Centre Léon Bérard); Joël Lachuer (ProfileExpert, Bron, France); and Gaël Grelier, Carole Audouy, Claire Ciancia, Fanny Courbis-Poncet, and Isabelle Durand for technical assistance. We also thank Eric Tabone (Centre de Ressources Biologiques, Centre Léon Bérard), Elisabeth Brambilla, and Jean Tanitakis for providing tumor samples; Gordon Peters and Takahiro Maeda for providing the luciferase reporter constructs; Patrizia Casalini for providing the *ErbB2* expression vector; R.A. Weinberg for providing the H-Ras^{V12} retroviral expression construct; G.P. Dimri for providing the Bmi-1 retroviral expression construct; and Ben Ho Park for providing the MCF10A-derived cell lines. The authors extend special thanks to Patrick Mehlen and Raphaël Rousseau for scientific discussions.

This work was supported by grants from the Institut National du Cancer, the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), the Ligue Nationale contre le Cancer, the Comités de l'Ain et du Rhône, and the Breast Cancer Research Foundation. R.M. is supported by the Italian Association for Cancer Research (AIRC).

Received: October 10, 2007

Revised: May 9, 2008

Accepted: June 11, 2008

Published: July 7, 2008

REFERENCES

- Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Gulberg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., et al. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**, 864–870.
- Bialek, P., Kern, B., Yang, X., Schrock, M., Sosic, D., Hong, N., Wu, H., Yu, K., Ornitz, D.M., Olson, E.N., et al. (2004). A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev. Cell* **6**, 423–435.
- Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., et al. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**, 725–730.
- Chen, Z.F., and Behringer, R.R. (1995). twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev.* **9**, 686–699.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., et al. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* **436**, 642.
- Cowell, J.K., Laduca, J., Rossi, M.R., Burkhardt, T., Nowak, N.J., and Matsui, S. (2005). Molecular characterization of the t(3;9) associated with immortalization in the MCF10A cell line. *Cancer Genet. Cytogenet.* **163**, 23–29.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817–825.
- Elias, M.C., Tozer, K.R., Silber, J.R., Mikheeva, S., Deng, M., Morrison, R.S., Manning, T.C., Silbergeld, D.L., Glackin, C.A., Reh, T.A., and Rostomily, R.C. (2005). TWIST is expressed in human gliomas and promotes invasion. *Neoplasia* **7**, 824–837.
- Entz-Werle, N., Stoetzel, C., Berard-Marec, P., Kalifa, C., Brugiere, L., Pacquement, H., Schmitt, C., Tabone, M.D., Gentet, J.C., Quillet, R., et al. (2005). Frequent genomic abnormalities at TWIST in human pediatric osteosarcomas. *Int. J. Cancer* **117**, 349–355.
- Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., DiTullio, R.A., Jr., Kastrinakis, N.G., Levy, B., et al. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**, 907–913.
- Guy, C.T., Webster, M.A., Schaller, M., Parsons, T.J., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. (1992). Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10578–10582.
- Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S., and Peters, G. (1996). Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 859–867.
- Hay, E.D. (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat. (Basel)* **154**, 8–20.
- Hoek, K., Rimm, D.L., Williams, K.R., Zhao, H., Ariyan, S., Lin, A., Kluger, H.M., Berger, A.J., Cheng, E., Trombetta, E.S., et al. (2004). Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res.* **64**, 5270–5282.
- Husemann, Y., Geigl, J.B., Schubert, F., Musiani, P., Meyer, M., Burghart, E., Fomi, G., Eils, R., Fehm, T., Riethmuller, G., and Klein, C.A. (2008). Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* **13**, 58–68.
- Kang, Y., and Massague, J. (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* **118**, 277–279.
- Konishi, H., Karakas, B., Abukhdeir, A.M., Lauring, J., Gustin, J.P., Garay, J.P., Konishi, Y., Gallmeier, E., Bachman, K.E., and Park, B.H. (2007). Knock-in of mutant K-ras in nontumorigenic human epithelial cells as a new model for studying K-ras mediated transformation. *Cancer Res.* **67**, 8460–8467.
- Kwok, W.K., Ling, M.T., Lee, T.W., Lau, T.C., Zhou, C., Zhang, X., Chua, C.W., Chan, K.W., Chan, F.L., Glackin, C., et al. (2005). Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res.* **65**, 5153–5162.
- Li, L., Cserjesi, P., and Olson, E.N. (1995). Dermo-1: a novel twist-related bHLH protein expressed in the developing dermis. *Dev. Biol.* **172**, 280–292.

- Linggi, B., Muller-Tidow, C., van de Loch, L., Hu, M., Nip, J., Serve, H., Berdel, W.E., van der Reijden, B., Quelle, D.E., Rowley, J.D., et al. (2002). The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nat. Med.* **8**, 743–750.
- Maestro, R., Dei Tos, A.P., Hamamori, Y., Krasnokutsky, S., Sartorelli, V., Kedes, L., Doglioni, C., Beach, D.H., and Hannon, G.J. (1999). Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 2207–2217.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**, 720–724.
- Mironchik, Y., Winnard, P.T., Jr., Vesuna, F., Kato, Y., Wildes, F., Pathak, A.P., Kominsky, S., Artemov, D., Bhujwala, Z., Van, D.P., et al. (2005). Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Res.* **65**, 10801–10809.
- Oft, M., Peli, J., Rudaz, C., Schwarz, H., Beug, H., and Reichmann, E. (1996). TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev.* **10**, 2462–2477.
- Ohuchida, K., Mizumoto, K., Ohhashi, S., Yamaguchi, H., Konomi, H., Nagai, E., Yamaguchi, K., Tsuneyoshi, M., and Tanaka, M. (2007). Twist, a novel oncogene, is upregulated in pancreatic cancer: clinical implication of Twist expression in pancreatic juice. *Int. J. Cancer* **120**, 1634–1640.
- Petrenko, O., Zaika, A., and Moll, U.M. (2003). deltaNp73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic Ras in cellular transformation in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5540–5555.
- Qian, Y., Zhang, J., Yan, B., and Chen, X. (2008). DEC1, a basic helix-loop-helix transcription factor and a novel target gene of the p53 family, mediates p53-dependent premature senescence. *J. Biol. Chem.* **283**, 2896–2905.
- Schardt, J.A., Meyer, M., Hartmann, C.H., Schubert, F., Schmidt-Kittler, O., Fuhrmann, C., Polzer, B., Petronio, M., Eils, R., and Klein, C.A. (2005). Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell* **8**, 227–239.
- Scheel, C., Onder, T., Karnoub, A., and Weinberg, R.A. (2007). Adaptation versus selection: the origins of metastatic behavior. *Cancer Res.* **67**, 11476–11479.
- Schmidt-Kittler, O., Ragg, T., Daskalakis, A., Granzow, M., Ahr, A., Blankenstein, T.J., Kaufmann, M., Diebold, J., Arnholdt, H., Muller, P., et al. (2003). From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 7737–7742.
- Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D., and DePinho, R.A. (1996). Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* **85**, 27–37.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593–602.
- Simpson, P. (1983). Maternal-zygotic gene interactions during formation of the dorsoventral pattern in *Drosophila* embryos. *Genetics* **105**, 615–632.
- Sosic, D., Richardson, J.A., Yu, K., Ornitz, D.M., and Olson, E.N. (2003). Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity. *Cell* **112**, 169–180.
- Thisse, B., el Messal, M., and Perrin-Schmitt, F. (1987). The twist gene: isolation of a *Drosophila* zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic Acids Res.* **15**, 3439–3453.
- Trost, T.M., Lausch, E.U., Fees, S.A., Schmitt, S., Enklaar, T., Reutzel, D., Brixel, L.R., Schmidtke, P., Maringer, M., Schiffer, I.B., et al. (2005). Premature senescence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells. *Cancer Res.* **65**, 840–849.
- Valsesia-Wittmann, S., Magdeleine, M., Dupasquier, S., Garin, E., Jallas, A.C., Combaret, V., Krause, A., Leissner, P., and Puisieux, A. (2004). Oncogenic co-operation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* **6**, 625–630.
- Wolf, C., Thisse, C., Stoetzel, C., Thisse, B., Gerlinger, P., and Perrin-Schmitt, F. (1991). The M-twist gene of *Mus* is expressed in subsets of mesodermal cells and is closely related to the *Xenopus* X-twi and the *Drosophila* twist genes. *Dev. Biol.* **143**, 363–373.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* **117**, 927–939.
- Zhang, Z., Xie, D., Li, X., Wong, Y.C., Xin, D., Guan, X.Y., Chua, C.W., Leung, S.C., Na, Y., and Wang, X. (2007). Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer. *Hum. Pathol.* **38**, 598–606.

RESUME

Résumé

Dans les neuroblastomes, le gène *N-MYC* est amplifié dans 20-25% des cas, associé à un mauvais pronostic. Au laboratoire, nous avons préalablement montré que la dérégulation de l'expression du gène *TWIST1* était corrélée à celle de *N-MYC* dans les neuroblastomes agressifs de stade IV avec une amplification de *N-MYC* (Valsesia-Wittmann et al. 2004). Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence que les gènes *TWIST1* et *TWIST2* étaient régulés positivement ou négativement de façon dose dépendante par les oncoprotéines Myc. De façon intéressante, le maintien de l'expression de *TWIST1* est dépendant de l'expression des protéines Myc. Ces résultats suggèrent que la dérégulation et l'amplification des oncoprotéines Myc dans les neuroblastomes *N-MYC* Amplifiés pourraient permettre l'induction sélective et le maintien de l'expression de l'oncogène *TWIST*, agissant comme facteur de survie.

Title

TWIST genes: transcriptional targets of *N-MYC* and *c-MYC* in neuroblastoma

Abstract

The *N-MYC* gene is amplified in 20-25% of human neuroblastoma, and this amplification is associated with poor clinical outcome. We previously reported a constant deregulation of *TWIST1* in synergy with *N-MYC* in aggressive stage IV neuroblastoma harboring *N-MYC* amplification (Valsesia-Wittmann et al. 2004). We demonstrated here that specifically in neuroblastoma cells, *TWIST1* and *TWIST2* are negatively or positively regulated depending on Myc oncoproteins dosage, thus being a putative Myc transcriptional target. We confirmed by EMSA that Myc proteins could bind *TWIST1* promoter. We further highlighted *TWIST1* maintenance of expression strictly Myc dependant. Therefore, we propose that deregulation and amplification of Myc oncoproteins in aggressive neuroblastoma tumors induce selective expression and maintenance of *TWIST1* oncogene, responsible for apoptosis resistance.

Mots clés

Neuroblastome, *N-MYC*, *c-MYC*, *TWIST1*, *TWIST2*, *DERMO1*, *ADAS*, apoptose, *E-box*, cancer, tumorigenèse

Key words

Neuroblastoma, *N-MYC*, *c-MYC*, *TWIST1*, *TWIST2*, *DERMO1*, *ADAS*, apoptosis, *E-box*, cancer, tumorigenesis

ONCOGENESE & PROGRESSION TUMORALE, Unité INSERM/UCBL U590
Centre Léon Bérard, 28 rue Laënnec, 69373 LYON CEDEX 08