

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université SAAD DAHLAB - Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département De Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière Science Biologique

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème

**ETUDE DE L'ONCOGÈNE NMYC DANS
LES NEUROBLASTOMES**

Présenté par :

Date de soutenance : 14-07-2021

*DJABER Fedoua

*HADJSADOK Sarra

Devant le jury :

Nom	Grade	/ Lieu	Qualité
Mme Mokrane A	M.C.B	USDB	Présidente
Mme Chalal N.H	M.C.B	USDB	Examinatrice
Mme Abdul Hussain A.S	M.C.A	USDB	Promotrice
Mr Belarbi A	Professeur	CHUD	Co-promoteur
Mr Kassa R	Docteur	CHUD	Invité d'honneur

Promotion : 2020-2021

Remercîments

Avec l'aide d'Allah le tout puissant, nous avons pu accomplir ce modeste travail

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer d'une manière très particulière nos sincères remerciements à notre promotrice **Mme. ABDUL HUSSAIN** et notre Co-promoteurs **Pr. BELARBI** et **Dr. KASSA** car ce modeste travail a été réalisé sous sa supervision et ses consignes, qui sans sa méthodologie, ses orientations et ses conseils précieux, n'aurait pas été accompli.*

*Je n'oublie pas également de remercier, **Mr. KHARROUBI** et **Mr. MAZZOUZ** et **Mme. DJABOUR**. Et à tous les personnels du service de laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Douera.*

Comme nous tenons également à adresser nos remerciements en signe de gratitude et de reconnaissance à :

*Aux membres du jury **Dr. MOKRANE** et **Dr. CHALLAL** qui ont pris la peine de lire et relire ce travail, de le corriger, et de nous honorer de leur présence et enfin d'évaluer ce mémoire.*

A tous les enseignants depuis le cycle primaire jusqu'aux études supérieures car c'est nous tenons aujourd'hui c'est grâce à leurs fonctions éminentes dans notre réussite la transmission de leurs connaissances et leur savoir-faire.

*A tous les enseignants du département de Biologie, à chef de département **Mme. BOUDJAMA** et chef d'options **Mme. SAADI**.*

A tout le personnel de la bibliothèque du département Biologie de Blida.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail aux êtres qui sont les plus chers au monde, les étoiles de ma vie.

A mon très cher père DJABER Hamoud

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous.

A ma très chère mère RIF Siham

Tu représentes pour moi le symbole de bonté par excellence, la source de ta tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Je souhaite que dieu les protège pour leur amour et leur sacrifice.

Aux fleurs de ma maison

Mes très chers frères Abderrahmane et Wail

Je souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.

A toute ma famille son exception

A ma chère sœur : Hadjsadok Sarra

A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.

A tous ceux que j'aime.

Merci !

DJABER FEDOUA

Dédicaces

Grace à Dieu le tout puissant, j'ai achevé la réalisation de ce modeste travail que je tien très chaleureusement à le dédier à :

} Ma mère chérie (DAOUDI NAIMA) et mon père (HADJSADOK BOUELAM) qui m'ont encouragé et soutenu tout au long de mes études et pour leurs patiences que Dieu les protègent et les gardes pour moi.

} A mes adorables frères ILYES et YOUNES.

} Et à mes très chères amis (DJABER Fedoua) et camarades pour tous les moments d'échange et de débat aux personnes qui m'ont toujours aidé et soutenue sans oublier mes cousines (DAOUDI Karima)....

HADJ SADOK SARRA

Résumé

Le neuroblastome est un cancer pédiatrique de système nerveux sympathique, le plus fréquent chez les enfants de moins de 15 ans avec une prédominance dans la médullosurrénale et représente environ 15% de tous les décès en oncologie pédiatrique. Il est issu des neuroblastes qui sont dérivés des cellules de la crête neurale formant au cours du développement embryonnaire pendant le processus de neurulation. L'International Neuroblastoma Pathologie Classification détermine 4 groupes histologiques des neuroblastomes ; Neuroblastome, Ganglioneuroblastome, Ganglioneurome, Ganglioneuroblastome nodulaire.

L'amplification et la surexpression de proto oncogène MYCN est un facteur pronostic défavorable pour le neuroblastome. Le gène NMYC est localisé sur le bras court du chromosome 2 ; il est impliqué dans la prolifération, la croissance cellulaire et la synthèse protéique. La connaissance de la nature et de la fonction du microenvironnement tumoral dans une tumeur devient essentielle, le paysage TME dans les NB suggère également des différences significatives entre les tumeurs amplifiées par MYCN et les tumeurs non amplifiées.

Nous avons réalisé une étude rétrospective par l'utilisation des techniques d'anatomopathologie et l'Hybridation Chromogénique *In Situ* (CISH).

Les résultats statistiques sur 20 patients montrent une prédominance dans les enfants de moins de 1 an, dans les filles que les garçons, la zone abdominale et les patients hautement amplifiées par NMYC sont plus dominant.

Les résultats d'histologie sur 01 patient montre une tumeur peu différenciée composée par des noyaux bleus arrondies avec formation de neuropile et des zones nécrosés, et celles qui sont obtenus par CISH sur 02 patients montrent une coupe hautement amplifiée NMYC et d'autre faiblement amplifiée.

Mots clés : Neuroblastome, NMYC, Hybridation, Amplification, Neuroblastes.

Abstract

Neuroblastoma is a pediatric sympathetic nervous system cancer, most common in children under 15 years of age with predominance in the adrenal medulla and accounts for approximately 15% of all pediatric oncology deaths. It arises from neuroblasts which are derived from neural crest cells forming during embryonic development during the process of neurulation. The International Neuroblastoma Pathology Classification identifies 4 histological groups of neuroblastomas; Neuroblastoma, Ganglioneuroblastoma, Ganglioneuroma, Nodular Ganglioneuroblastoma.

The amplification and overexpression of the proto oncogene MYCN is an unfavorable prognostic factor for neuroblastoma. The NMYC gene is located on the short arm of chromosome 2; it is involved in proliferation, cell growth and protein synthesis. Knowledge of the nature and function of the tumor microenvironment in a tumor becomes essential, the TME landscape in NB also suggests significant differences between tumors amplified by MYCN and unamplified tumors.

We performed a retrospective study using pathology techniques and Chromogenic *In Situ* Hybridization (CISH).

The statistical results on 20 patients show a predominance in children under 1 year, in girls than boys, the abdominal area and patients highly amplified by NMYC are more dominant.

The histology results on 01 patient show a poorly differentiated tumor composed by rounded blue nuclei with neuropil formation and necrotic areas, and those obtained by CISH on 02 patients show a highly amplified NMYC section and other weakly amplified .

Key words: Neuroblastoma, NMYC, Hybridization, Amplification, Neuroblasts.

ملخص

الورم الأرومي العصبي هو سرطان الجهاز العصبي الودي للأطفال الأكثر شيوعًا عند الأطفال دون 15 سنة مع الظهور بكثرة في الغدة الكظرية ويمثل ما يقارب 15 ٪ من جميع وفيات الأورام عند الأطفال. ينشأ من الخلايا العصبية المشتقة من خلايا القمة العصبية التي تتشكل أثناء التطور الجنيني أثناء مرحلة تشكل الجهاز العصبي . يحدد التصنيف الدولي لعلم أمراض الورم الأرومي العصبي 4 مجموعات نسيجية من الأورام الأرومية العصبية ؛ ورم أرومي عصبي ، ورم أرومي عصبي عقدي ، ورم عصبي عقدي ، ورم أرومي عصبي عقدي مركب.

التضخيم والإفراط في التعبير عن الجين الورمي MYCN عامل تنبؤي غير موثٍ للورم العصبي. يقع في الذراع القصير للكروموسوم 2 ، وهو يشارك في التكاثر ونمو الخلايا وصنع البروتين. اصبح معرفة طبيعة ووظيفة البيئة الدقيقة للورم . يشير منظر TME في NB إلى اختلافات كبيرة بين الأورام المضخمة MYCN و الأورام غير المضخمة .

أجرينا دراسة بأثر رجعي باستخدام تقنيات علم الأمراض والتهجين الكروموجيني في الموقع (CISH).

تظهر النتائج الإحصائية على 20 مريضًا اغلبية عند الأطفال أقل من سنة واحدة ، وعند الفتيات أكثر من الأولاد ، منطقة البطن والمرضى الذين لديهم تضخيما عاليا MYCN هم الأكثر هيمنة.

تظهر نتائج الأنسجة على مريض 01 وربما متباينًا بشكل سيئ يتكون من نوى زرقاء مستديرة مع تكوين عصبي نخرية. و تلك التي حصل عليها CISH على مريضين تظهر قسم MYCN مضخم للغاية و اخر مضخم بشكل ضعيف.

الكلمات الرئيسية : الورم الأرومي العصبي ، MYCN ، التهجين ، التضخيم ، الخلايا العصبية .

Abréviation

❖ ALK	Kinase du lymphome anaplasique
❖ BM	Boit myc
❖ BMP	Bone morphogenetic protein
❖ CCN	Cellules de crête ceurale
❖ CHD5	Chromodomain-helicase DNA Binding Protein 5
❖ C-MYC	Cellular-MYC
❖ EMT	Epithelial mesenchymal transition
❖ EGF	Epidimial Growth Factor
❖ FGF	Fibroblaste growth factor
❖ HVA	Homovanilic acide
❖ HSR	Homogeneous Staining Region
❖ HIF-1	Hypoxie Induced Factor 1
❖ INSS	International Neuroblastoma Staging System
❖ INPC	International Neuroblastoma Pathologie Classification
❖ IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
❖ IGF-1	Insulin Growth Factor 1
❖ KIFAB	Heterodimaimerization Kinesin-2
❖ LDH	Lactate Dehydrogenase
❖ MYCN	Neuroblastome-myc
❖ MAX	Myc Associated Factor X
❖ MIBG	Scintigraphie à Métaiodobenzyl Guanidine
❖ NB	Neuroblastome
❖ NMA	NMYC Amplifiées
❖ NMNA	NMYC Non Amplifie
❖ p _p NTs	Tumeur Neuroblastique Péripheriques
❖ P53	Tumour Protein 53 KDa
❖ PDGF	Plaquetel Drived Growth Factor
❖ RTK	Recepteur Tyrosine Kinase
❖ SNP	Système nerveux périphérique
❖ α -SMA	α -Smooth Muscle Actin
❖ TME	Tumour microenvironment
❖ VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor A

Glossaire

- **Fibroblastes associés au cancer (CAF)** : Est le type de cellule le plus courant dans le tissu conjonctif, ils jouent un rôle central dans un processus complexe d'interaction entre les tumeurs et le stroma et favorisent la croissance tumorale.
- **Ganglioneuroblastome** : Un type rare de tumeur neuroectodermique primitive.
- **Ganglioneurome** : Une tumeur neurogène bénigne de l'enfant et de l'adulte jeune.
- **Ganglioneuroblastome** : Une variante du neuroblastome entouré par des cellules ganglionnaires.
- **MYCN** : Un proto-oncogène situé sur chromosome 2, et connue comme un facteur de transcription.
- **Neuroblastome** : Un cancer qui prend naissance dans les cellules nerveuses (neuroblastes) immatures du système nerveux sympathique.
- **Progénitrice** : Cellule issue d'une cellule souche multipotente, qui ne présente pas encore de signe de différenciation mais qui, après trois ou quatre divisions, donne naissance à une ou plusieurs lignées cellulaires.
- **Stroma** : synonyme de milieu extracellulaire, et un tissu non cancéreux présent dans tous les types de cancers invasifs (sauf leucémie).

Liste des figures

Figure 1	Localisation des neuroblastomes	Page 3
Figure 2	Les crêtes neurales	Page 4
Figure 3	Rôle de NMYC dans la cancérogenèse	Page 5
Figure 4	Classification histologique des tumeurs neuroblastiques	Page 7
Figure 5	Scintigraphie à la métaiodobenzylguanidine (mIBG)	Page 8
Figure 6	Localisation des gènes MYCN et ALK sur chromosome 2	Page 10
Figure 7	Structure de protéine MYCN	Page 11
Figure 8	L'amplification de proto-oncogène MYCN	Page 13
Figure 9	Structure de MYCN et MAX et fonction de la protéine MYCN	Page 14
Figure 10	Schéma d'interaction de MYCN avec P53	Page 16
Figure 11	Contribution de MYCN au paysage TME dans le NB	Page 19
Figure 12	Modèle schématique des voies de régulation impliquées dans la stabilisation de Mycn	Page 20
Figure 13	L'appareil d'inclusion	Page 26
Figure 14	Microtome	Page 27
Figure 15	Montage de lamelle sur la lame	Page 29
Figure 16	Sonde NMYC	Page 32
Figure 17	Schéma de dénaturation et d'hybridation d'ADN	Page 32
Figure 18	Principe de CISH monocolore pour la détection des altérations génomiques	Page 33
Figure 19	Répartition de NB selon le sexe	Page 34
Figure 20	Répartition de NB selon l'âge	Page 35
Figure 21	Répartition de NB selon le siège	Page 35
Figure 22	Répartition de NB selon le niveau d'amplification de NMYC	Page 36
Figure 23	Photo microscopique d'une coupe histologique de la glande surrénale	Page 37
Figure 24	Coupe histologique d'un neuroblastome surrénalien	Page 38
Figure 25	Photo microscopique montre un statut NMYC hautement amplifié	Page 40
Figure 25	Photo microscopique montre un statut NMYC faiblement amplifié	Page 41

Liste des tableaux

Tableau I	Facteurs de risqué	Page 9
Tableau II	Expression de gène MYCN	Page 12
Tableau III	Matériel non biologique	Page 21
Tableau IV	Comptage des spots NMYC hautement amplifié dans 30 noyaux	Page 40
Tableau V	Résultat d'hybridation de NMYC hautement amplifié	Page 41
Tableau VI	Comptage des spots NMYC faiblement amplifié dans 30 noyaux	Page 42
Tableau VII	Résultat d'hybridation de NMYC faiblement amplifié	Page 43

Sommaire

	Remerciements et dédicaces	
	Résumé (Français, Arabe, Anglais)	
	Liste des abréviations	
	Glossaire	
	Liste des figures et des tableaux	
	Introduction	Page 1
Partie 1	Recherche bibliographique	
Chapitre I	Tumeur neuroblastique	
I-1	Généralité	Page 2
I-2	Epidémiologie	Page 2
I-3	Origine des neuroblastomes	Page 3
I-4	Cancérogenèse	Page 4
I-5	Classification histopathologique	Page 5
I-6	Diagnostic	Page 7
I-7	Facteurs génétiques héréditaires	Page 8
I-8	Facteurs de risque	Page 9
Chapitre II	L'oncogène N-MYC	
II-1	Le gène N-MYC	Page 10
II-2	Protéine N-MYC	Page 11
II-2.1	Structure des protéines Myc	Page 11
II-3	Expression et régulation des gènes MYC	Page 12
II-4	Amplification de N-myc	Page 13
II-5	MYCN et Fonction	Page 13
II-6	MYCN et apoptose	Page 15
Chapitre III	Microenvironnement tumorale	
III-1	Les fibroblastes associés au cancer (CFA)	Page 17
III-2	Cellules stromales	Page 17
III-2.1	La TME schwannienne dans le NB	Page 17
III-2.2	Vascularisation des tumeurs MYCN amplifiée (MYCN-A)	Page 17
III-3	Cellules immunitaires	Page 18
III-4	Croissance et différenciation cellulaires du neuroblastome	Page 19
Partie 2	Recherche expérimental	
Chapitre I	Matériel et méthodes	
	Matériel non biologique	Page 21
	Matériel biologique	Page 22
I-2	Etude anatomopathologique	Page 23
I-3	L'hybridation <i>in situ</i>	Page 30
Chapitre II	Résultat et discussion	
II-1	Etude statistique	Page 34
II-2	Aspect microscopique	Page 38
II-3	Discussion	Page 43
	Conclusion	Page 46
	Références bibliographiques	
	ANNEXE	

Le neuroblastome est une tumeur embryonnaire dérivée des cellules primitives du système nerveux sympathique, la plus fréquente et la plus mortelle chez les nourrissons et les enfants de moins de 15 ans (Brodeur *et al*, 2003), La majorité de ces tumeurs se développent dans la médullaire surrénalienne, tandis que les autres se développent dans les ganglions sympathiques paraspinaux du cou, de la poitrine, de l'abdomen ou du pelvis ou du bassin (Maris *et al*, 2010). Le neuroblastome est généralement sporadique mais des cas familiaux avec une prévalence d'environ 1 à 2 % sont également signalés (Malis *et al*, 2013), Deux gènes ont été proposés comme prédisposant au neuroblastome, le gène régulateur de la neurogenèse PHOX2B (Trochet *et al*, 2013) et le gène ALK récepteur orphelin à activité tyrosine kinase (Mossé *et al*, 2008).

Les tumeurs neuroblastiques proviennent de précurseurs du système nerveux sympathique issus de la crête neurale et sont très hétérogènes sur le plan clinique et biologique (Maris *et al*, 2007), Par conséquent, l'INPC reconnaît 4 catégories de tumeurs neuroblastiques périphériques ; neuroblastome, ganglioneuroblastome nodulaire, ganglioneuroblastome mélangé et ganglioneurome (Peuchmaur *et al*, 2004).

L'amplification et la surexpression du proto-oncogène MYCN se produit dans environ 20 % des neuroblastomes et sont associées à un stade avancé de la maladie (Deyell *et al*, 2011) à une progression rapide de la tumeur et à un mauvais pronostic. MYCN code pour le régulateur transcriptionnel N-myc, qui s'est avéré réguler à la fois vers le haut et vers le bas de nombreux gènes cibles impliqués dans le cycle cellulaire, les dommages à l'ADN, la différenciation et l'apoptose dans le neuroblastome (Buckley *et al*, 2010).

L'amplification de l'oncogène MYCN peut affecter la nature et la fonction de la TME dans les tumeurs NB et que les vésicules extracellulaires (VE) représentent un mécanisme de communication entre les cellules tumorales et les cellules non malignes dans la TME (Blavier *et al*, 2020), Les protéines MYCN ciblent les voies prolifératives et apoptotiques vitales pour la progression du cancer. L'amplification du gène *MYCN* est apparue comme l'un des indicateurs les plus clairs d'un neuroblastome (Gustafson *et al*, 2010).

Alors quel est le rôle d'amplification de l'oncogène NMYC dans les tumeurs neuroblastiques ?

L'objectif de notre travail est d'étudier l'aspect anatomo-pathologique et l'amplification de l'oncogène NMYC dans les neuroblastomes, ainsi que maîtriser la technique chromogénique in situ (CISH) et des technique d'histologie à travers une étude rétrospective.

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

I. Tumeur neuroblastique

I.1. Généralités

Le neuroblastome (NB) est la tumeur solide extra-crânienne la plus fréquente chez l'enfant. Les NB proviennent à partir des cellules immatures du système nerveux sympathique, les appelés neuroblastes (Schwab et *al.*, 2003). La grande majorité des tumeurs sont sporadiques, bien que certains cas familiaux soient décrits. La plupart des tumeurs se trouvent dans l'abdomen, souvent dans la médullaire surrénale, ou ailleurs dans le corps humain où les composants du système nerveux sympathique sont présents. Les NB appartiennent au sous-groupe des petites tumeurs à cellules bleues rondes (Brodeur et *al.*, 2003).

I.2. Epidémiologie

Les neuroblastomes représentent environ 10% des tumeurs solides de l'enfant de moins de 15 ans, c'est le troisième cancer infantile le plus fréquent, après les leucémies et les tumeurs cérébrales. Plus de 600 cas sont diagnostiqués aux Etats-Unis chaque année (Goodman et *al.*, 1999), et représente 0.38% des tumeurs solides de l'enfant de moins de 15 ans, en Algérie d'après le service médicale d'Alger.

La plupart des NB (90 %) sont diagnostiqués avant l'âge de 5 ans et l'âge médian de survenue est d'environ 22 mois, le taux d'incidence du neuroblastome est de 1,2 cas pour 100 000 et représente environ 15 % de tous les décès en oncologie pédiatrique (Schwab et *al.*, 2003).

Les taux de survie à cinq ans sont variables, les cas à risque faible (LR) ou intermédiaire (IR) ayant des taux de survie supérieurs à 90 % et les cas à haute risque HR des taux de survie de 40 à 50 % seulement. Le neuroblastome à HR est présent dans environ 40 % des cas et est associé à une chimiorésistance et à une rechute tumorale (Matthay et *al.*, 1999 ; Cheung et *al.*, 2001).

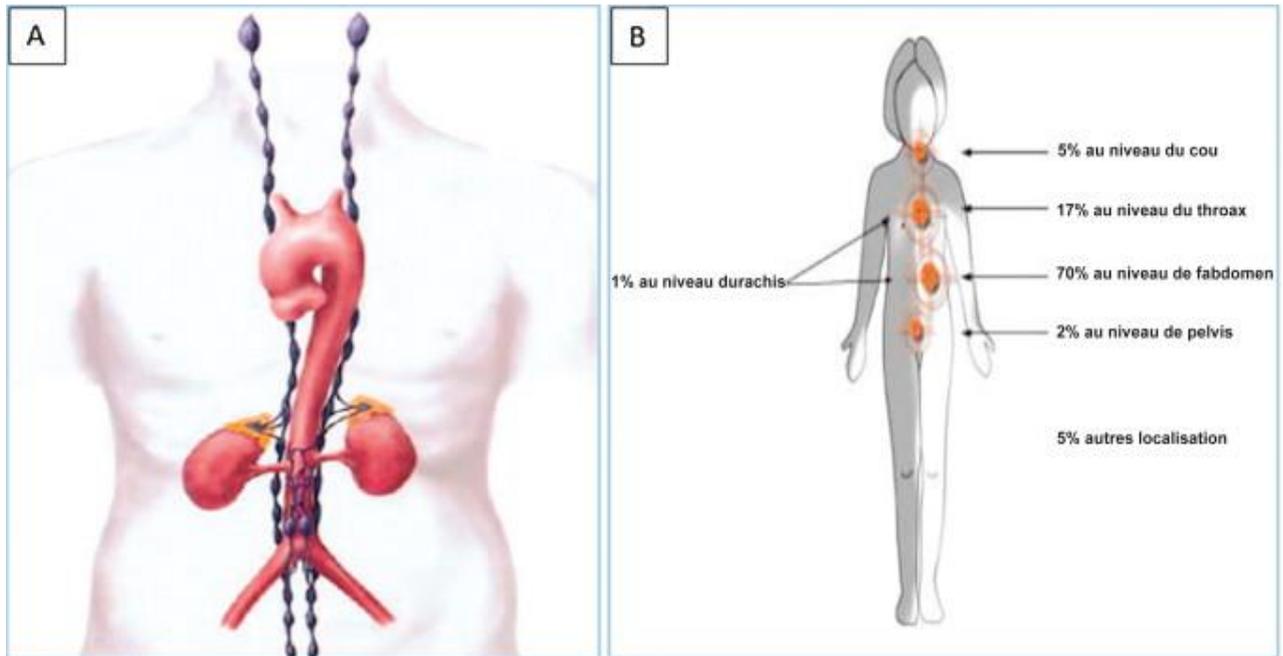


Figure 1 : Localisation des neuroblastomes (Munier et *al* ; 2012)

I.3. Origine des neuroblastomes

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 de la crête neurale qui se forment au cours du développement embryonnaire pendant le processus de neurulation (Betancur et *al.*, 2010).

La partie dorsale de l'ectoderme forme la plaque neurale qui, par invagination, permet ensuite la mise en place du tube neural (Betancur et *al.*, 2010); Grâce à une transition épithéliale-mésenchymateuse, les cellules de la crête neurale (CCN) sont capables de se délaminer et de migrer de leur emplacement initial vers de nombreux sites distants dans l'embryon; on peut distinguer quatre grands types fonctionnels de NCC : crânien, cardiaque, du tronc ainsi que vagal et sacré (Bronner et *al.*, 2016). Les NCC de la partie tronc migrent ventrolatéralement vers l'aorte dorsale. Les cellules qui restent à cet endroit se différencient en cellules progénitrices sympathiques en réponse à des facteurs extrinsèques et intrinsèques. Ces cellules progénitrices vont générer les cellules des ganglions sympathiques et de la glande surrénale, à partir desquelles se développent les tumeurs de type neuroblastome (Furlan et *al.*, 2017).

La maturation, la migration, la spécification et la différenciation des cellules de la crête neurale sont des processus étroitement contrôlés guidés par des réseaux de régulation génique, constitués de divers facteurs de transcription. Ces facteurs de transcription sont activés

séquentiellement par des facteurs externes tels que les BMP, Wnt et FGF (Tomolonis et *al.*, 2018).

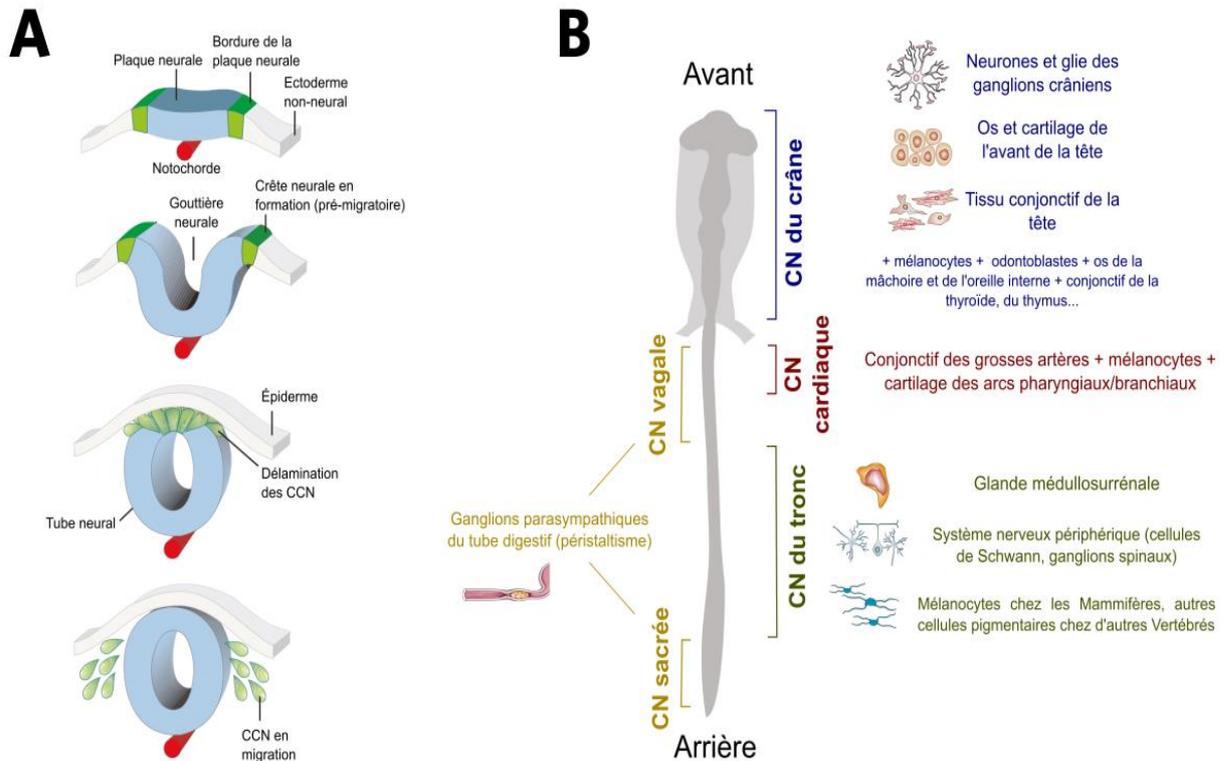


Figure 2 : Les crêtes neurales (Simoes et *al.*, 2015 ; Knecht et *al.*, 2002)

(A) Embryologie des cellules des crêtes neurales (CCN). Les CCN (en vert) sont originaires des bordures de la plaque neurale (un épaissement du neurectoderme, en bleu), qui, lorsqu'elles se replient au cours de la neurulation, forment des « crêtes » entourant la gouttière neurale. Après l'invagination du neurectoderme, les cellules de la partie dorsale du tube neural se détachent (délamination) et commencent à migrer : ce sont les CCN (Simoes et *al.*, 2015).

(B) Les différents domaines de la crête neurale (CN) ainsi que leurs principaux dérivés (Knecht et *al.*, 2002).

I.4. Cancérogenèse

Lors du développement du système nerveux périphérique (SNP) le gène N-MYC agit comme un facteur de cellules souches cancéreuses dans la crête neurale en développement et favorise la tumorigenèse dans le neuroblastome. 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 (Groves et *al.*, 2014).

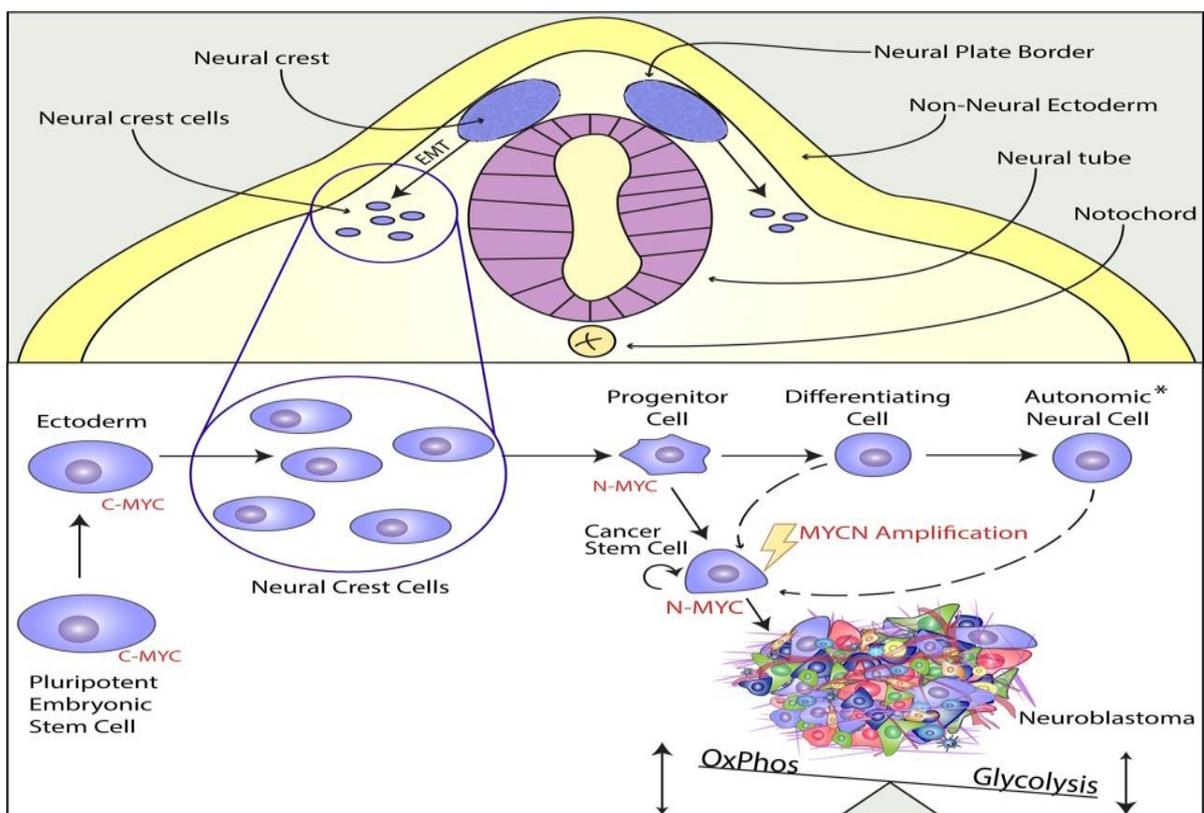


Figure 3 : Rôle de NMYC dans la cancérogenèse (Groves et *al.*, 2014)

C-Myc est le principal régulateur des cellules pluripotentes du développement embryonnaire précoce, MycN est fortement exprimé dans les cellules multipotentes de la crête neurale migratoire et post-migratoire. Lors de la différenciation, l'expression de MYCN est régulée à la baisse et les cellules précurseurs sympathosurrénales ou les cellules progénitrices se transforment en différents types cellulaires de la lignée cellulaire neuronale autonome, tels que les cellules ganglionnaires sympathiques, les cellules chromaffines de la médullosurrénale ou les cellules du système nerveux périphérique.

L'expression aberrante de MYCN induit un phénotype unique de type cellule souche cancéreuse en permettant un auto-renouvellement infini, une résistance apoptotique et via une reprogrammation métabolique caractérisée par une glycolyse accrue associée à une phosphorylation oxydative active. Le neuroblastome en formation est constitué des populations cellulaires hétérogènes (Groves et *al.*, 2014).

I.5. Classification histopathologique

L'INPC a mis en place l'International Neuroblastoma Pathologie Classification, classification histologique des tumeurs neuroblastiques périphériques pNTs détermine 4 groupes histologiques distincts en fonction principalement de la maturation des neuroblastes et de la densité du stroma Schwannien : (Shimada et *al.*, 1999 ; Peuchmaur et *al.*, 2004)

1. Neuroblastome (Stroma schwannien pauvre)-NB : Les tumeurs de cette catégorie comprennent trois sous-types : indifférenciés, peu différenciés et différenciés. Les NB sont caractérisés par le schéma de croissance typique des cellules neuroblastiques, la prolifération/développement des cellules de Schwann est nulle ou limitée (<50% du tissu tumoral).

2. Ganglioneuroblastome (Schwannian stroma-rich)-GNB-I : Il s'agit d'une forme de transition entre le neuroblastome et le ganglioneuroblastome. Les tumeurs de ce ganglioneuroblastome contiennent des nids microscopiques. Ces nids sont composés d'un mélange de cellules neuroblastiques à différents stades de différenciation. Les nids sont mélangés ou distribués de façon aléatoire dans le tissu ganglionnaire. Le stroma de schwann contenant des cellules ganglionnaires incorporées individuellement. Par définition, plus de 50 % du tissu tumoral doit avoir un aspect ganglioneuromateux avec une prolifération/un développement schwannien (stroma riche schwannien).

3. Ganglioneurome (Stroma Schwannien-dominant)-GN : Les tumeurs de cette catégorie sont caractérisées par la présence de cellules ganglionnaires distribuées individuellement dans le stroma schwannien. Deux sous-types, en voie de maturation et mature, sont inclus dans cette catégorie. Le sous-type premier contient à la fois des cellules ganglionnaires matures et en voie de maturation, tandis que le sous-type mature ne contient que des cellules ganglionnaires matures recouvertes de cellules satellites.

4. Ganglioneuroblastome nodulaire (Composite, stroma riche/stroma dominant de Schwann et stroma pauvre) -GNB-N : Le terme "composite" implique que la tumeur de cette catégorie est

composée de plusieurs éléments histologiques biologiquement différents (clones). Les tumeurs se caractérisent par la présence d'éléments macroscopiques visibles, souvent hémorragique et/ou nécrotique (Bernardi et *al.*, 2008 ; Okamatsu et *al.*, 2009).

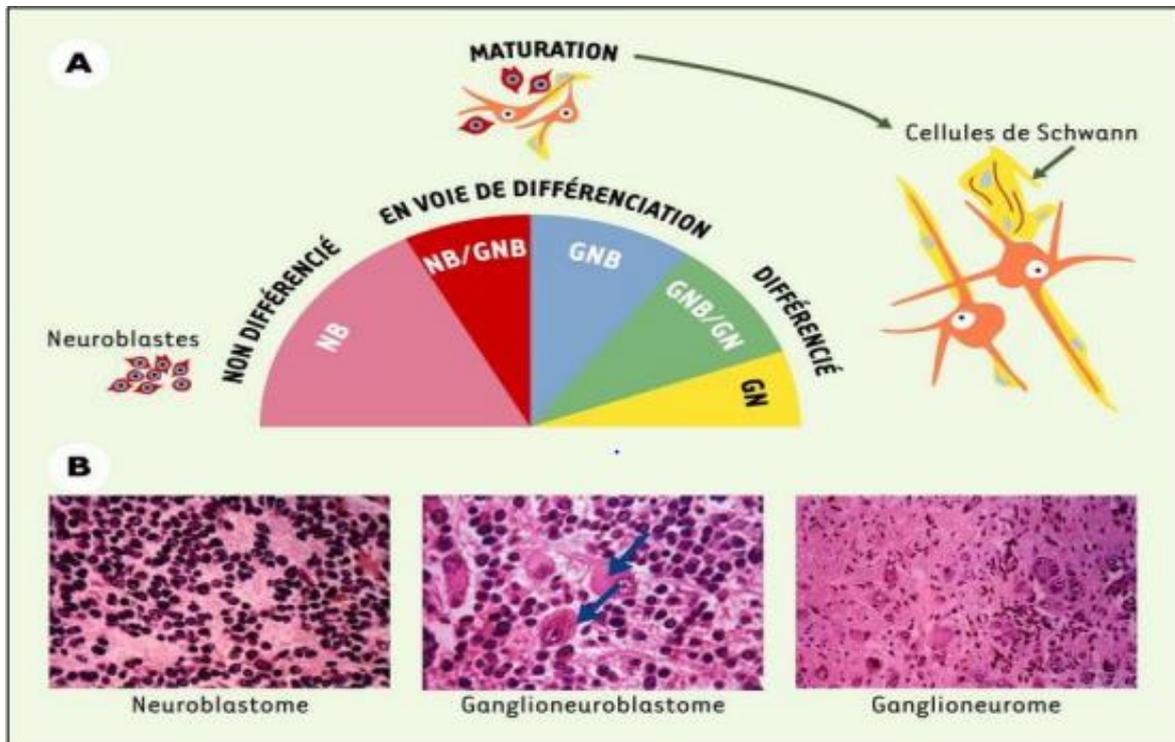


Figure 4 : Classification histologique des tumeurs neuroblastiques (Douc et *al.*, 2004)

I.6. Diagnostic

Il s'agit de l'examen clinique pendant lequel le médecin va observer, écouter et palper l'enfant pour repérer une éventuelle masse ou des symptômes spécifiques provoqués par la présence d'un neuroblastome : hématomes, points douloureux, foie trop gros, présence de ganglions, distension abdominale. Cet examen permet d'orienter le reste du bilan.

L'échographie anténatale de routine permet parfois de détecter un neuroblastome. L'enfant qui présente des symptômes abdominaux ou une masse abdominale doit subir une échographie ou une TDM ou une IRM. Le diagnostic du neuroblastome est alors confirmé par la biopsie de la masse identifiée (Stark et *al.*, 1983).

On fait une analyse d'urine pour savoir si celle-ci renferme certaines substances chimiques. Certaines cellules du neuroblastome peuvent produire des substances appelées catécholamines. Lorsqu'elles se décomposent, les catécholamines forment des acides appelés acide homovanillique (HVA) et acide vanilmandélique (VMA). Si la concentration de ces acides

dans l'urine est plus élevée que la normal, cela peut indiquer la présence d'un neuroblastome (Strenger et *al.*, 2007).

Lors d'une analyse biochimique sanguine, on mesure le taux de certaines substances chimiques dans le sang. Tell que, la ferritine peut libérée par les cellules du neuroblastome. Les enfants qui ont des taux de ferritine élevée ont tendances à avoir un pronostic plus sombre, le taux de lactate déshydrogénase (LHD) peut être représentatif de la quantité de cancer dans le corps de l'enfant et la vitesse de croissance de tumeur (Silber et *al.*, 1991).

Lors d'une biopsie, le médecin prélève des tissus ou des cellules du corps afin qu'ils soient analysés en laboratoire. La technique histologique, l'immunohistochimie (IHS) et l'hybridation *in situ* sont utilisée pour maitre en évidence et identifié les cellules tumorales et la présence ou l'absence d'amplification de N-Myc (Campagna et *al.*, 2018).

Scintigraphie à la métaiodobenzylguanidine (mIBG) est un marquer à l'iode radioactif. Cette scintigraphie révèle une fixation aussi bien sur la tumeur primitive que sur les métastases osseuses (Sharp et *al.*, 2011).



Figure 5 : Scintigraphie à la métaiodobenzylguanidine (mIBG) (Maris et *al.*, 2007)

I.7. Facteurs génétiques héréditaires

Plusieurs observations confirment que l'hypothèse d'influence de facteurs génétiques héréditaires sur l'étiologie de neuroblastome tell que, les mutations de gain de fonction dans le domaine tyrosine kinase du gène ALK (Mossé et *al.*, 2008 ; Janoueix-Lerosey et *al.*, 2008)

Deuxièmement, Les troubles du développement liés à la crête neurale associés à un risque accru de développer un neuroblastome ont été associés à des mutations inactivatrices dans le gène PHOX2B, un régulateur majeur du développement de la crête neurale, identifié comme la première mutation de prédisposition au neuroblastome (Trochet *et al.*, 2005).

De plus, de rares cas de caryotypes constitutionnels aberrants ont été décrits chez des patients atteints de neuroblastome, y compris des anomalies constitutionnelles du nombre de copies, des translocations équilibrées et déséquilibrées et des délétions chromosomiques spécifiques, y compris des délétions du chromosome 1p (Vandepoele *et al.*, 2008).

I.8. Facteurs de risque de neuroblastome

Nombreuses études ont confirmé l'influence des facteurs environnementaux sur l'étiologie de neuroblastome, telle que l'âge, grossesse, la consommation de médicament durant la grossesse et le mode de vie.

Tableau I : Facteurs de risque

Facteurs	Caractéristiques
Age	<ul style="list-style-type: none"> - Facteur clinique pronostique. - Les nourissant ayant un pronostic meilleur que les enfants.
Grossesse	<ul style="list-style-type: none"> - Les antécédents maternels de fausse couche antérieure (Hamrick <i>et al.</i>, 2001 ; Buck <i>et al.</i>, 2001) - L'augmentation du risque avec une naissance très prématurée et l'accouchement prématuré peut augmenter le risque (Hamrick <i>et al.</i>, 2001).
Consommation des médicaments	<ul style="list-style-type: none"> - Consommation des hormones sexuelles 3 mois avant ou pendant la grossesse (Olshan <i>et al.</i>, 1999) - Utilisation des médicaments neuronal actifs, telle que amphétamines, antidépresseur, relaxants musculaires (Kramer <i>et al.</i>, 1987). - L'utilisation maternelle des multivitamines pendant la grossesse (Olshan <i>et al.</i>, 2002).
Mode de vie	<ul style="list-style-type: none"> - Consommation de l'alcool pendant la grossesse quotidiennement était associée à un risque neuf et six fois plus élevé (Kramer <i>et al.</i>, 1987). - Il existe un risque accru de tabagisme chez la mère pendant la grossesse (Olshan <i>et al.</i>, 2000).

CHAPITRE

II

II. L'oncogène N-MYC

Le gène N-MYC fait partie de la famille des gènes MYC, est un proto-oncogène, qui comprend également deux autres membres chez l'Homme : C-MYC et L-MYC (Adhikary *et al.*, 2005 ; Pelengaris *et al.*, 2005). Ces trois gènes codent pour des facteurs de transcription (Dang *et al.*, 2006).

L'expression dérégulée des membres de la famille MYC est associée au développement d'une grande partie des tumeurs humaines (Dang *et al.*, 2012), Le N-MYC est surexprimé à la fois dans les tumeurs du système nerveux (p. Ex., Neuroblastome, médullo-blastome (Davis *et al.*, 1999 ; Northcott *et al.*, 2012); rétinoblastome (Lee *et al.*, 1984) ; astrocytome (Garson *et al.*, 1985); et glioblastome multiforme (Bjerke *et al.*, 2013 ; Swartling *et al.*, 2012). Mais le rôle du N-MYC dans la biologie des tumeurs dans l'activation des propriétés semblables aux cellules souches (par exemple, l'auto-renouvellement) (Kawagoe *et al.*, 2007).

II.1. Le gène N-MYC

Le gène N-myc est localisé sur le bras court du chromosome 2q24 (figure 6) (Van Roy *et al.*, 2009), Il est impliqué dans la prolifération et la croissance cellulaire et la synthèse protéique. Il code pour 2 protéines de 456 et 464 aa, via 2 sites d'initiation de la traduction différents (van Noesel *et al.*, 2004). Ces deux protéines N-Myc sont respectivement 58 et 64 kDa (Makela *et al.*, 1989).

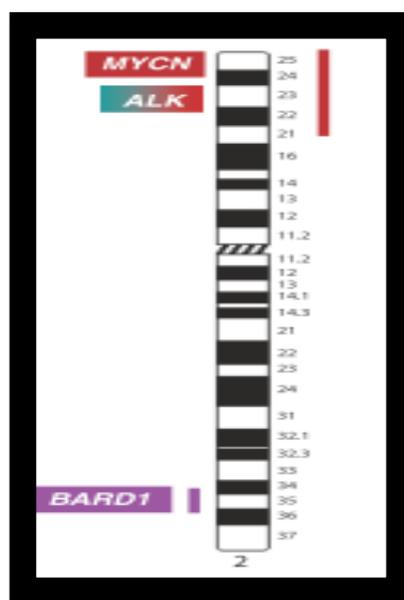


Figure 6 : Localisation des gènes MYCN et ALK sur le chromosome 2 (Van Roy *et al.*, 2009)

II.2. Protéine N-MYC

N-MYC est une protéine bHLH-LZ qui se lie à l'ADN d'une manière Spécifique avec une protéine partenaire hétérodimérique, MAX (Wenzel *et al.*, 1991).

II.2.1. 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 (Cowling *et al.*, 2006) (Figure 6).



Figure 7 : Structure de protéine MYCN (Westermarck *et al.*, 2011)

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 boîte 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 superdomaine 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) (Murre et *al.*, 1989).

II.3. Expression et régulation des gènes MYC

II.3.1. Développement embryonnaire

Généralement, L'expression de MYCN a été décrite comme voire ubiquitaire. Dans rôle, il est exprimé dans de nombreux tissus [Tableau II]. En analysant l'état de prolifération des cellules, l'expression de gène MYCN est 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).

Tableau II: Expression de gène MYCN

Gène	Age	Tissu
N-MYC	Embryon	Cerveau, rétine, cristallin (Zimmerman et <i>al.</i> , 1986;Hirning et <i>al.</i> , 1991)
		Poumon (Zimmerman et <i>al.</i> , 1986; Mugrauer et <i>al.</i> , 1988; Hirning et <i>al.</i> , 1991)
		Bourgeon dentaire (Hirning et <i>al.</i> , 1991)
		Rein, intestin (Zimmerman et <i>al.</i> , 1986)
		Follicule pileux, rein, foie (Mugrauer et <i>al.</i> , 1988)
		Cœur (Mugrauer et <i>al.</i> , 1988; Zimmerman et <i>al.</i> , 1986)
	Adulte	Cœur (Zimmerman et <i>al.</i> , 1986)

En outre, Haining et ses collaborateurs ont également prouvé que l'expression de N-MYC est maintenue dans les étapes initiales de différenciation du cerveau, de la rétine, du cristallin et de l'intestin (Hirning et *al.*, 1991). Par conséquent, l'expression de N-MYC sera une caractéristique de la première étape de différenciation.

II.3.2. Chez l'adulte

Généralement, Les gènes N-MYC ne sont pas exprimés chez l'adulte à l'exception d'une faible expression 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 N-MYC dans Le neurone qui participe à la tumorigenèse du cancer du neuroblastome (Erisman et *al.*, 1985).

II.4. Amplification de N-myc

L'amplification du gène N-myc a été mise en évidence en 1983 dans des lignées cellulaires dérivant de neuroblastomes humains et dans une tumeur primaire. C'est un des premiers exemples de marqueur génétique influençant une prise en charge thérapeutique. Il s'agit d'une amplification sous forme de matériel génétique supplémentaire soit extra-chromosomique circulaire, le "chromosome double-minute" (DM) soit intra-chromosomique appelé HSR (Homogeneous Staining Region) (Schwab et *al.*, 1983).

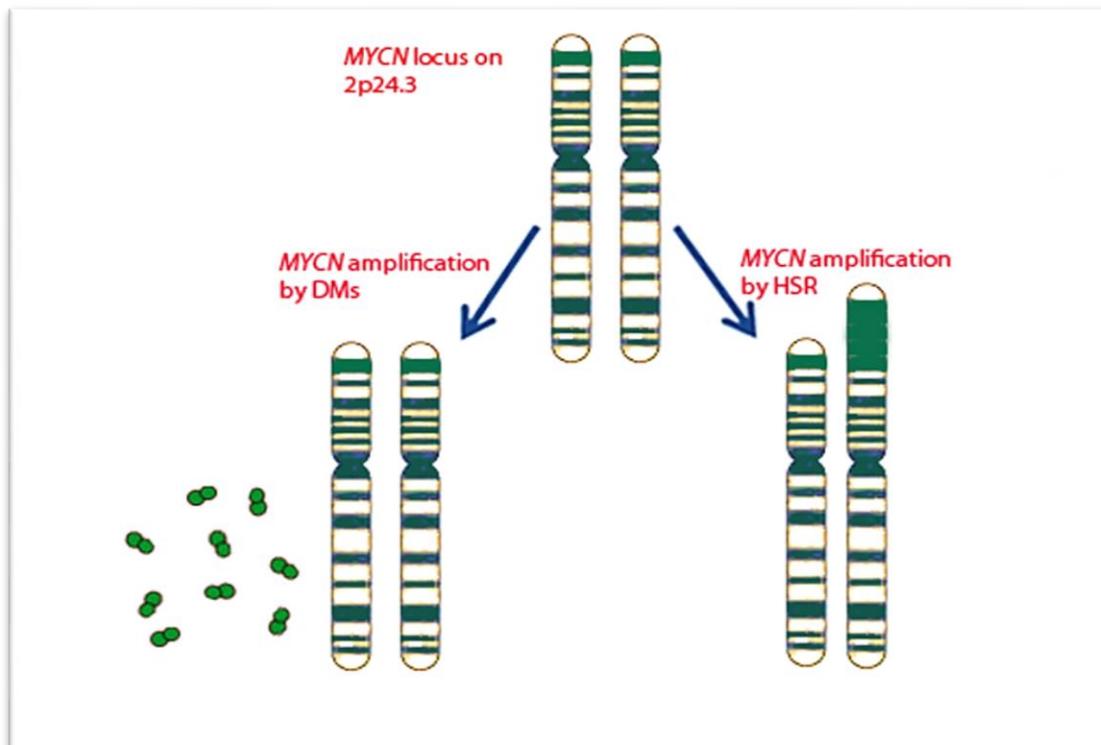


Figure 8 : L'amplification de proto-oncogène MYCN (Dasilva., et *al* 2013)

MYCN est exprimé de manière transitoire au cours du développement neuronal normal et définit la direction de la différenciation neuronale. MYCN est fréquemment amplifié dans le neuroblastome de stade avancé (Schwab et *al.*, 1984), et la biologie du neuroblastome à haut risque est influencée par la surexpression ultérieure de l'oncoprotéine MYCN (Mac et *al.*, 2000 ; Boon et *al.*, 2001). L'expression du gène N-myc peut augmenter considérablement le taux de métastase, On parle d'amplification quand on retrouve plus de 10 copies par génome

haploïde. Elle est corrélée au stade avancé de la maladie et est associée aux neuroblastomes ayant un pronostic défavorable (Brodeur GM, et *al.*, 1984).

II.5. MYCN et Fonction

Comme les autres protéines MYC, MYCN est un facteur de transcription qui contrôle l'expression de nombreux gènes cibles, qui à leur tour régulent les processus cellulaires fondamentaux tels que la prolifération, la synthèse des protéines de croissance cellulaire, le métabolisme, l'apoptose et la différenciation (Eilers et *al.*, 2008). La protéine se compose d'un domaine d'activation de la transcription amino-terminal et d'un domaine d'interaction de liaison à l'ADN et de pro-éine carboxy-terminal. Les protéines MYC se lient aux séquences E-box (CACGTG) dans un complexe hétérodimérique avec Max (figure 10).

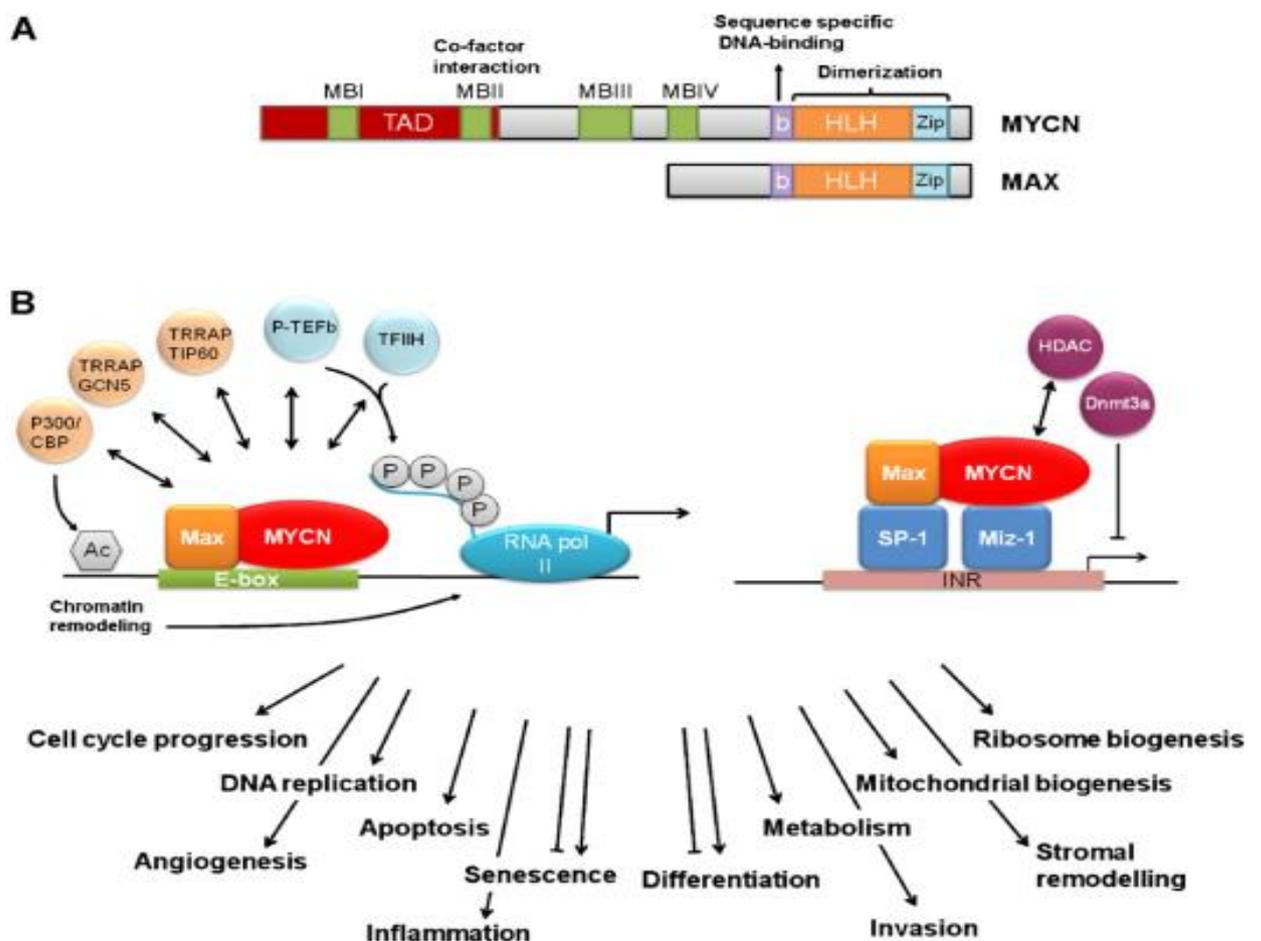


Figure 9 : Structure de MYCN et MAX et fonction de la protéine MYCN (Westermarck et *al.*, 2011).

(A) représentation schématique de la structure de la protéine MYCN et de sa protéine partenaire Max. Des domaines fonctionnels importants sont représentés; Boîte MYC (MB), domaine de transactivation (TAD), région basique (b), hélice-boucle-hélice (HLH) et Leucine-zipper (Zip).

(B) MYCN influence une multitude de processus cellulaires par la régulation de l'expression génique.

Panneau de gauche: La transactivation par le dimère MYCN-Max se produit lors de la liaison à la séquence E-box. Recrutement d'histone acétyl transférases (HAT), y compris les complexes TRRAP contenant p300 / CBP, Tip60 et GCN5, conduisant à un état de chromatine ouvert et la phosphorylation activée par MYCN du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II, entraînant un allongement de la transcription stimulé.

Panneau de droite: Répression médiée par MYCN de la transcription induite par Miz-1 / Sp-1. Le dimère MYCN-Max recrute des facteurs comprenant les histones désacétylases (HDAC) et l'ADN méthylase 3a (Dnmt3a), qui interviennent dans un état de chromatine réprimé et l'inhibition de la transcription induite par Miz-1 / SP-1. Par la régulation de l'expression génique, MYCN influence de nombreux processus intracellulaires et extracellulaires comme indiqué.

II.6. MYCN et apoptose

Au cours de l'apparition précoce du neuroblastome, la cellule d'origine dépend de l'auto-renouvellement pour maintenir la croissance tumorale en tant que processus homéostatique. Il est connu des cellules pluripotentes qu'un stress cellulaire accru peut perturber cette homéostasie, inhiber l'auto-renouvellement et induire la différenciation ou la sénescence. Le P53 peut atténuer le stress cellulaire en contrôlant les dommages à l'ADN ou en réduisant la phosphorylation oxydative (Fu et *al.*, 2020).

La transformation oncogène et la reprogrammation cellulaire sont des processus similaires qui sont entravés par des barrières intrinsèques aux cellules. Un mécanisme critique est l'induction de l'apoptose ou de la sénescence facilitée par p53, est essentiel pour l'auto-renouvellement des cellules indifférenciées et est étroitement régulé au niveau de l'ARNm, ainsi qu'au niveau des protéines (Jain et *al.*, 2018). Ainsi, l'inhibition de p53 augmente

l'efficacité de la reprogrammation, mais au prix d'un stress oxydatif accru, d'un raccourcissement des télomères et d'un risque plus élevé de dommages à l'ADN (Fu et *al.*, 2018). Cependant, C-myc et N-myc peuvent tous deux se lier au promoteur p53 et induire son expression sans provoquer l'apoptose, indiquant des effets anti-apoptotiques supplémentaires régulés par Myc (Chen et *al.*, 2010 ; Reisman D et *al.*, 1993).

Le principal antagoniste de p53 est Mdm2, une E3–ligase contribuant à l'ubiquitination et à la répression de p53. Mdm2 est directement induit par N-myc mais régule également N-myc de manière rétroactive (Slack et *al.*, 2005 ; Gu et *al.*, 2012). Dans le neuroblastome, Mdm2 peut agir comme un facteur favorisant la tumeur, N-myc régule le réseau transcriptionnel autour de p53 pour surmonter ces barrières intrinsèques, similaire à l'activation artificielle du programme de pluripotence dans les cellules somatiques saines (Figure 9).

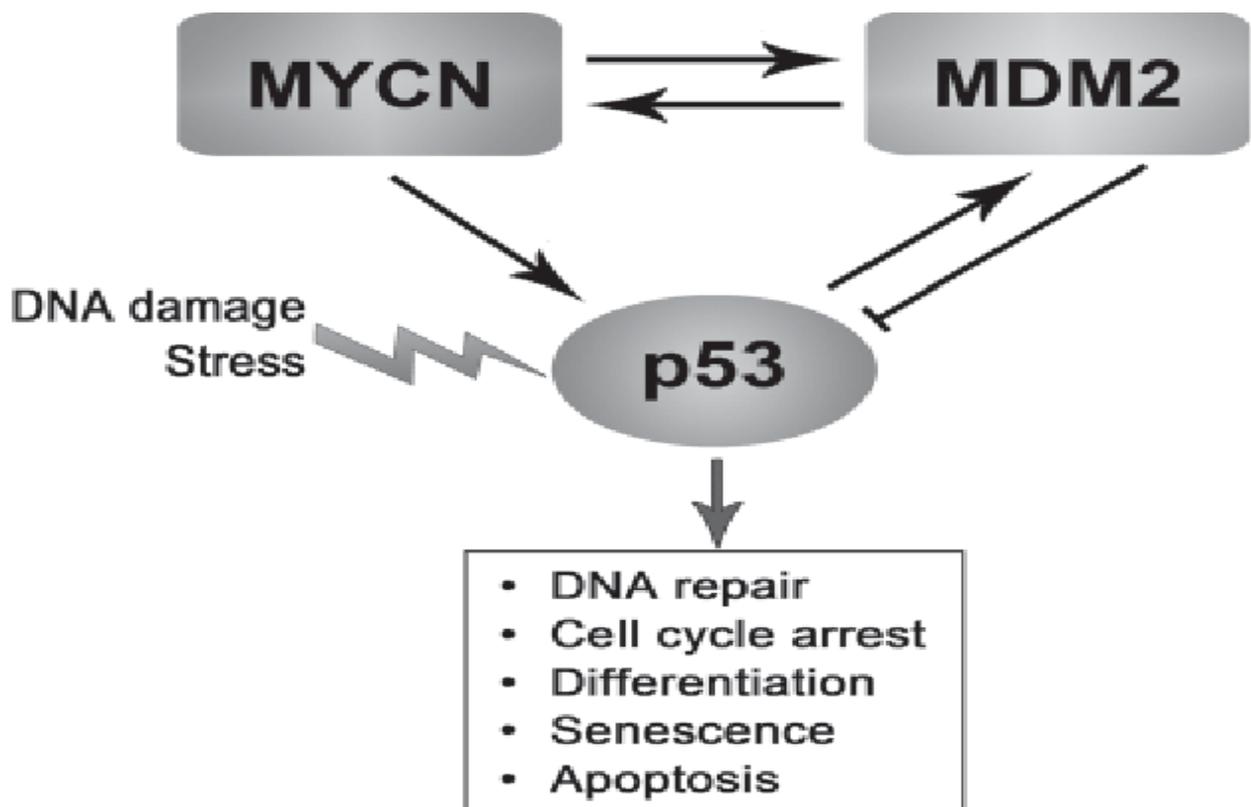


Figure 10 : Schéma d'interaction de MYCN avec P53 (Inomistova et *al.*, 2015)

CHAPITRE

III

III. Microenvironnement tumorale

La tumeur native est composée de composants cellulaires ; structurels et moléculaires connus collectivement sous le nom de microenvironnement tumorale (TME) ; qui supporte une multitude de voies de signalisation. La TME accueille une population cellulaire hétérogène de cellules cancéreuses et non cancéreuses telle que les fibroblastes, les cellules stromales et les cellules immunitaires (Borriello et *al.*, 2015 ; Cheung et *al.*, 2016).

III.1. Les fibroblastes associés au cancer (CAF)

Les CAF représentent une population hétérogène des cellules mésenchymateuses exprimant une variété de marqueurs tels que la protéine spécifique des fibroblastes (FSP)-1, les protéines d'activation des fibroblastes- α (FAP)- α , α -SMA, le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR)- β , et l'intégrine β 1 (CD29) (Costa et *al.*, 2016). Contrairement aux fibroblastes normaux au repos, les CAF prolifèrent rapidement, sécrètent une abondance de protéines de la matrice extracellulaire (MEC), dont le collagène et la fibronectine, et sont migrateurs. Lorsqu'ils sont activés par la présence des cellules tumorales (Kalluri et *al.*, 2016).

III.2. Cellules stromales

III.2.1. La TME schwannienne dans le NB

La TME du neuroblastome est principalement composée des cellules neuroblastiques et des cellules de Schwann dans des proportions différentes. Ces deux types cellulaires ont les mêmes cellules souches progénitrices de la crête neurale et sont présents à différents degrés de différenciation dans le neuroblastome (Pajtler et *al.*, 2014). La présence de CS dans les tumeurs du NB définit un groupe de tumeurs "riches en stroma" associé à une issue favorable (Shimada et *al.*, 1995).

Les tumeurs à haut risque MYCN-A (MYCN amplifié) sont sensiblement pauvres en CS et les tumeurs NB riches en CS présentent rarement MYCN (Mobley et *al.*, 2015).

III.2.2. Vascularisation des tumeurs MYCN amplifiée (MYCN-A)

Les tumeurs du NB développent leur vascularisation en partie par la production de VEGF-A contrôlée par des facteurs de croissance tels que le facteur de croissance analogue à l'insuline-1 (IGF-1), le facteur de croissance épidermique (EGF) ou le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et par l'hypoxie.

En conséquence, les analyses de tumeur ont révélé des niveaux de vascularisation tumorale plus élevés dans les tumeurs MYCN-A que dans les tumeurs MYCN non amplifiée (MYCN-NA). Les tumeurs MYCN-A ont une expression plus élevée de l'intégrine $\alpha\beta3$ dans leurs CE (cellule endothéliale), ce qui stimule la fixation des CE à la vitronectine et la migration, ainsi que la prolifération et la survie (Meitar *et al.*, 1996).

III.3. Cellules immunitaires

Il est bien connu que MYCN entraîne une régulation négative de l'expression des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I dans le NB, ce qui contribue à la présentation des antigènes tumoraux et est nécessaire au déclenchement d'une attaque immunitaire (Bernards *et al.*, 1986 ; Lenardo *et al.*, 1989). Cette absence d'expression d'antigènes dans le NB est responsable de la capacité bien connue des tumeurs MYCN-A à échapper à une réponse immunitaire médiée par les cellules T cytotoxiques (CTL) et les interférons (Layer *et al.*, 2017). Cependant, la contribution de MYCN au recrutement des cellules immunitaires dans la tumeur et à la composition du microenvironnement immunitaire tumoral (TIME) commence seulement à être explorée.

Une analyse transcriptomique a identifié une diminution de six types des cellules immunitaires (cellules CD8+T, cellules CD4+T, cellules B, macrophages, CD et cellules NK) dans les tumeurs MYCN-A par rapport aux tumeurs MYCN-NA et une présence plus élevée des cellules myéloïdes et lymphoïdes (DCs, Th2, CD8+T cells, NKT cells, macrophages) dans les tumeurs MYCN-NA par rapport aux tumeurs MYCN-A (Zhong *et al.*, 2019). En revanche, les tumeurs MYCN-NA sont moins vascularisées, contiennent moins de cellules α -SMA+ et d'autres cellules stromales, mais sont plus infiltrées de cellules immunitaires innées et adaptatives, en partie grâce à leur plus forte expression de chimiokines qui sont dérégulées par MYCN. Les tumeurs MYCN-A apparaissent donc typiquement "froides" et exclusives du système immunitaire, alors que les tumeurs MYCN-NA semblent enflammées ou "chaudes" (Wang *et al.*, 2015).

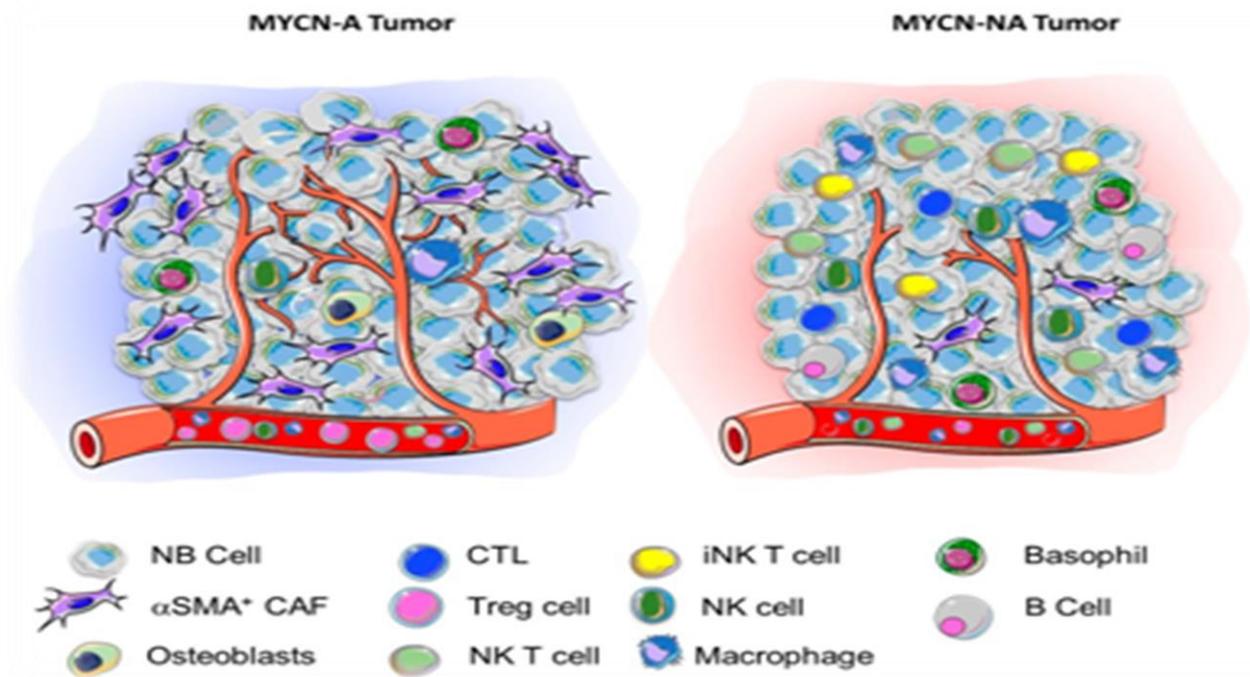


Figure 11 : Contribution de MYCN au paysage TME dans le NB (Blavier et al., 2020).

III.4. Croissance et différenciation cellulaires du neuroblastome

Dans les cellules en prolifération, Mycn est initialement phosphorylé à la sérine 62 par la kinase 1/CyclinB dépendante de la cycline. Nuclear Mycn se lie à son partenaire, le facteur de transcription hélice-boucle-hélice Max et stimule la transcription d'un gène cible important dans le cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation et l'apoptose.

Cette phosphorylation d'amorçage en S62 permet la liaison de Gsk3 β , ainsi que Pin1 et PP2A dans un complexe contenant également de l'Axine. Active Gsk3 β phosphoryle Mycn à la thréonine 58, produisant Mycn doublement phosphorylé, stabilisé et transcriptionnellement actif.

La dégradation de MYCN est nécessaire pour la différenciation terminale des précurseurs neuronaux afin que le contrôle de la protéine MYCN soit étroitement contrôlé d'une manière spécifique au cycle cellulaire. Les protéines MYC se lient à un complexe de dégradation du protéasome qui comprend la kinase Aurora A (AURKA), les ubiquitine ligases E3 (FBXW7 et HUWE1) (Gustafson *et al.*, 2010).

La signalisation en amont commence au niveau de la membrane avec des récepteurs tyrosine kinases (RTK), qui sont soit activés par le ligand, soit par des mutations activatrices constitutives

(dans Alk, par exemple). Les RTK activent la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), qui catalyse la conversion du phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-3, 4,5-triphosphate (PIP3). PIP3 se lie alors à Akt, le localisant à la membrane et permettant la phosphorylation et l'activation d'Akt par Pdk1 lié à la membrane à la thréonine 308. L'Akt actif phosphoryle ensuite le glycogène synthase kinase 3 β (Gsk3 β) et l'inactive, bloquant la phosphorylation médiée par Gsk3 β de Mycn T58 et stabilisant ainsi Mycn (Gustafson *et al.*, 2010).

L'activité aberrante de PI3K/mTOR dans le neuroblastome est en corrélation avec un mauvais pronostic, entraîne une stabilisation oncogène de MYCN (Opel *et al.*, 2007) et peut être ciblée à l'aide d'inhibiteurs cliniques de PI3K/mTOR pour lesquels les doses recommandées de phase II ont été établies chez les enfants (Gore *et al.*, 2013 ; Schenone *et al.*, 2011). Des essais de phase précoce de composés actifs contre PI3K ou mTOR sont en cours en utilisant des inhibiteurs de rapalogue de dernière génération tels que le temsirolimus et le ridaforolimus, qui ont amélioré la biodisponibilité et l'inhibition du complexe mTOR (mTORC)-1 et mTORC-2 (Jessen *et al.*, 2009).

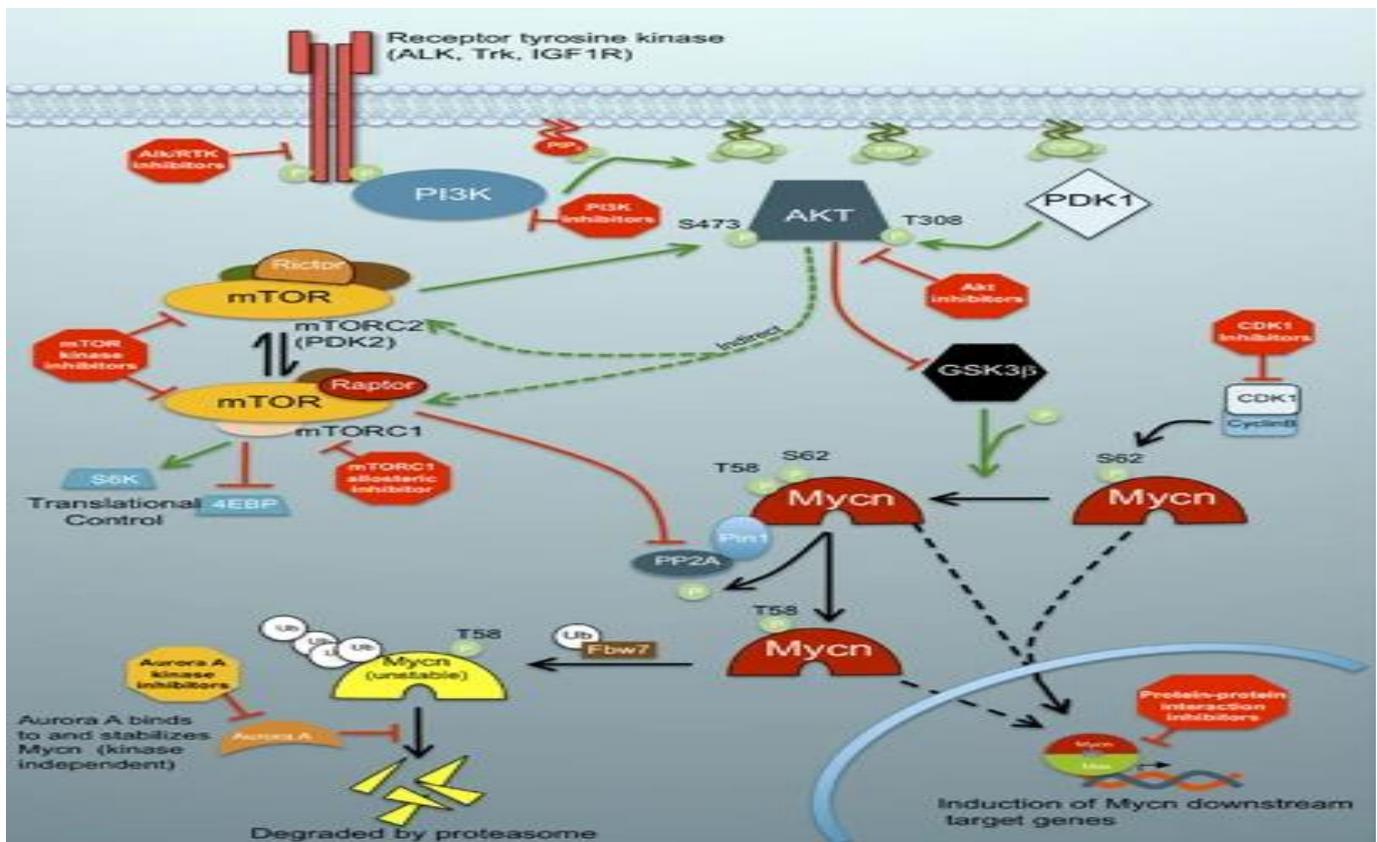


Figure 12 : Modèle schématique des voies de régulation impliquées dans la stabilisation de Mycn (Gustafson *et al.*, 2010)

PARTIE

EXPÉRIMENTAL

CHAPITRE I

L'incidence des différents types de cancers recensent d'augmenter chaque année et en particulier au sein de notre population, Ainsi les neuroblastomes parmi les cancers modèles pertinent.

Notre mémoire de fin de cycle est une étude rétrospective réalisée au niveau de service d'anatomo-pathologie du CHU Douera pendant 2 mois (13 avril- 18 juin). Cette étude a consisté à utiliser des techniques histologiques, et moléculaires telles que l'hybridation in situ (CISH), pour voir la morphologie de tissu tumorale neuroblastique, et d'identifier l'amplification d'oncogène NMYC.

I. Matériel

I.1. Matériel non biologique

Afin de réaliser des analyses, le laboratoire d'anatomo-pathologie est muni d'équipements de base. Le tableau suivant représente le matériel utilisé pour notre étude (ANNEXE 3).

Tableau III: Matériel non biologique

Appareillage	Matériel et verreries
- Automate	- Cassettes
-Appareil d'inclusion	- Une pince
- Microtome	- Cuves
- Plaque chauffante	- Lames rodées / Lames silanisées
- Etuve	- Lamelles
-Coverstainer automate	- Panier de lames
- Hybridizer	- Micropipettes

Réactifs	Kit d'hybridation <i>in situ</i> (CISH)
- Formol (36%)	- Peroxydase d'hydrogène (3 %)
-Alcool (éthanol) A 80,90 et 100 %	- PT2 (Heat Pretraitement Solution EDTA)
- Xylène	- ES1 (Pepsin Solution)
- Eau distillée et eau de robinet	- WB1 (Wash Buffer SSC)
- Paraffine	- WB5 (20x Wash Buffer TBS)
- Hématoxyline	- AB14 (Anti-DIG /DNP-mix)
- Eosine	- AB13 (HRP/AP-Polymer-mix)
- Eukitt	- SB7a (HRP-Green Solution A)
	- CS2 (Nuclear Bleu Solution)
	- Fixogum

I.2. Matériel biologique

Ce laboratoire étudie les lésions macroscopiques et microscopiques des tissus prélevés sur les patients (vivants ou décédés) par ablation ou biopsie.

- Pièce opératoire : Désigne tout ce qui est retiré lors d'une chirurgie (tumeur+tissus sain autour d'elle ganglion...) A l'issue de la chirurgie toute pièce opératoire est envoyée au service d'anatomopathologie afin d'être analysée et établir un diagnostic.
- Les biopsies : Des prélèvements des fragments de tissu sur un être vivant. Lorsqu'une anomalie est décelée, un prélèvement au niveau de cette anomalie doit être réalisé afin d'analyse au microscope et établir un diagnostic.

II. Etude anatomopathologique

Le laboratoire d'anatomopathologie joue un rôle essentiel dans le diagnostic, le pronostic et le suivi des cancers et d'autres états pathologiques. Il s'acquitte de ce rôle en menant l'examen macroscopique, microscopique et moléculaire de pièces de biopsie ou de tissus prélevés dans le cadre le chirurgicales ou d'autopsies.

II.1. Fixation

Immersion des prélèvements dans un liquide fixateur, le formol pur (36%). Le formaldéhyde ou formol (HCHO) est un gaz incolore et inflammable, utilisé le plus souvent sous forme de solution tamponnée en histopathologie.

La fixation a pour but d'immobiliser des constituants cellulaires et tissulaires dans un état voisin que possible de l'état vivant ; pour éviter l'autolyse et la putréfaction (par constituant de ponts protéiques).

Les facteurs influençant l'étape de fixation sont d'une part le temps puisque la fixation doit se faire dans le plus rapidement possible après le prélèvement au minimum 5 min ; D'autre part, la quantité de fixateur doit être suffisante c'est-à-dire dix fois le volume du prélèvement pour s'assurer de sa bonne pénétration dans le tissu.

II.2. Examen macroscopique

L'examen macroscopique (à l'œil nu) est la première étape à réaliser dans l'étude histopathologique pour étudier les caractéristiques morphologiques dans le but de localiser et d'observer la lésion, évaluer son étendue et éventuellement déterminer sa nature.

Ces étapes sont faites dans une salle spéciale (salle d'examen macroscopique), où l'échantillon (pièce opératoire ou biopsie) est placé sur une large plaque en bois, avec arrivée d'eau courante et les fragments sont dénombrés, orientés, mesurés, et leur aspect externe est décrit.

On Utilise un ciseau pour ouvrir la pièce opératoire fermée ou bien un couteau pour la coupe en deux ou en plusieurs fragments, puis les coupes sont déposées dans des cassettes numérotées et imprégnées dans un liquide fixateur (formol) pendant 24 à 48 h.

On dépose les biopsies sur un papier transparent ; puis dans des cassettes numérotées et imprégnées dans un formol coloré par l'éosine.

II.3. Circulation

Cette étape peut se faire manuellement ou à l'aide d'une automate et a pour principe le remplacement de l'eau qui est dans les tissus par une substance totalement hydrophobe, telle que la paraffine qui se présente sous forme de substance blanche (ANNEXE 4).

a. Déshydratation

Se fait par immersion du panier pendant 2 heures dans des bains de l'éthanol croissants (la concentration est de plus en plus importante). Les prélèvements sont placés dans trois bains successifs d'éthanol de degrés : 70°, 95° et 100°.

Cette étape permet la déshydratation des tissus pour faciliter une bonne pénétration du xylène aux tissus.

b. Eclaircissement

Se fait par immersion du panier dans trois bains de xylène (2h chacun), c'est un agent appartenant à la famille des hydrocarbures et présente l'avantage d'être moins toxique que le toluène.

Cette étape permet la pénétration de xylène dans les tissus pour l'éclaircissement et avoir un tissu transparent.

c. Imprégnation

Elle consiste en le remplacement du xylène présent dans les cellules par la paraffine liquide. Les prélèvements sont placés successivement dans trois bains de paraffine en fusion (à 60°) afin de s'assurer de l'imprégnation totale du tissu.

II.4. Inclusion

L'inclusion consiste en un enrobage des fragments coupés dans les cassettes par la paraffine, cette paraffine en se rigidifiant permettra de conserver les rapports architecturaux des structures tissulaires les uns par rapport aux autres et de fournir un support rigide pendant et après la coupe.

Elle permet la réalisation de coupes et obtenir une forme de bloc à l'aide d'un appareil spécial ; l'appareil d'inclusion, c'est un appareil de trois consoles, permettant de réaliser toutes les étapes de l'enrobage.

- 1- Console thermique, préchauffage des moules en acier inoxydable et au stockage chaud, les tissus traités à la température 60c°.
- 2- Console d'enrobage à la température = 70c°, comporte une plaque où se fait l'enrobage.
- 3- Console réfrigérante, destinée à refroidir des blocs de paraffine coulés à la température = -4c°

➤ **Mode opératoire**

Les cassettes placées dans le bac d'attente de poste d'inclusion, sont traitées de la manière suivante :

- Sortir une cassette du bac et ouvrir prudemment son couvercle et l'hôter tout en vérifiant qu'il n'y a pas de fragment restant sur le couvercle.
- Prendre un moule adapté à la taille du prélèvement.
- Saisir un seul fragment à la fois à l'aide d'une pince métallique, le déposer délicatement au centre du moule (le plan de section doit être positionné contre le fond du moule) de façon que la surface de la coupe permette d'observer simultanément toutes les structures tissulaires (internes et externes).
- Verser la paraffine liquide sur le fragment dans le moule.
- Poser le moule sur une console de refroidissement, lorsque le bloc est bien refroidi, on procède au démoulage.
- Après le refroidissement, on retrouve un bloc de paraffine dur à l'intérieur duquel le fragment est inclus.



Figure 13 : L'appareil d'inclusion; a. choix de moule ; b. Versement de paraffine

II.5. Microtomie

Les blocs ayant refroidis sur la plaque réfrigérante de la station d'enrobage, la découpe peut être réalisée. A l'aide d'un microtome, des coupes allant de 1 à 3 μm d'épaisseur sous forme de ruban sont réalisées. Cette épaisseur permet aux rayons lumineux du microscope de traverser la préparation et d'éviter la superposition tissulaire (ANNEXE 4).

➤ Mode opératoire

- Immobiliser le porte objet dans son sens vertical.
- Fixer le bloc sur le porte objet.
- Glisser le rasoir et rapproche le chariot de l'objet.
- Régler l'échelle graduée à 20 μm et dégrossir le bloc de paraffine. Le bloc prêt à être coupé:
- Régler l'échelle encore une fois à l'épaisseur de coupe = 5 μm (micromètre).
- Sous l'action de la chaleur produite par le frottement avec la lame de rasoir la paraffine fond légèrement ce qui permet aux sections tissulaires d'adhérer les uns aux autres et de former un ruban.
- Saisir à l'aide de deux aiguilles métalliques l'extrémité du ruban et le tirer délicatement pour faire l'étalement.

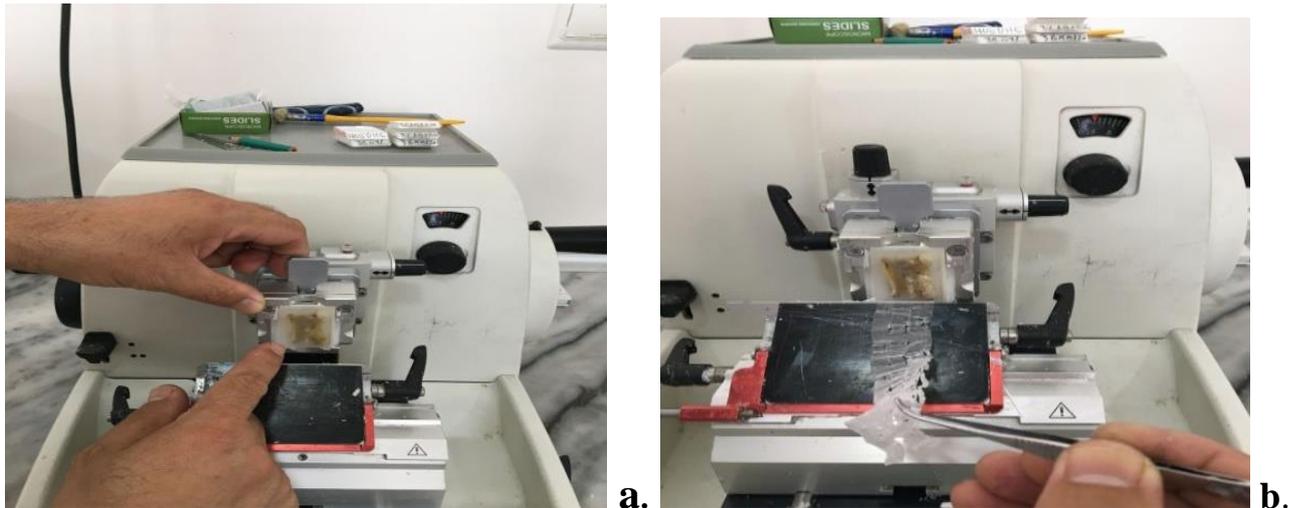


Figure 14 : Microtome ; a. Installation de bloc sur le porte objet ; b. Réalisation d'un ruban

II.6. Coloration

a. Etuvage des lames

Rejeter l'excès de liquide et poser les lames sur la plaque chauffante quelque minute, puis les placer sur un portoir d'une façon verticale.

Toutes les lames sont déposées dans l'étuve à 40°C pendant 24h, pour une meilleure adhérence du tissu. Cette étape est dite séchage, elle permet d'éliminer la fine couche d'eau qui se dépose entre la lame et tissu.

b. Déparaffinage

Pour cela, il est nécessaire de préparer le tissu. Tout d'abord on Mettre le portoir successivement dans 2 bains de xylène pendant 10 minutes, pour le déparaffinage. Cette étape permet une meilleure imprégnation de ces derniers par le colorant.

c. Réhydratation

La réhydratation est pour but de chasser le xylène du tissu et de le remplacer par l'eau étant donné que la plupart des colorants sont de nature aqueuse. Elle se traduit par le passage dans cinq bains d'éthanol, les deux premiers contenant de l'éthanol absolu durent 3 à 5 minutes et sont suivis de trois bains de 95°, 80° et 70°. Enfin, les lames sont rincées à l'eau courante pendant 3 minutes.

d. Coloration

Mettre le portoir dans un bain de l'hématoxyline pendant 6 à 10 minutes pour colorer le noyau en couleur noir violacé, l'hématoxyline est un colorant naturel, elle doit être préalablement oxydée en hémateïne pour exercer sa fonction. Puis rincer à l'eau courante.

Passage du portoir dans le bain d'éosine alcoolique à 0.02% (4 à 6 minutes) pour voir le cytoplasme en rose sous microscope. Rincer le portoir à l'eau courant.

Utilisé le safran pour colorer les fibres de collagène en couleur jaune. Puis mises dans trois bains d'éthanol de concentration croissante (70°,95°et 100°) et ce pour déshydrater le tissu.

Finalement, elles sont plongées dans un bain de xylène pour éclaircir le tissu en attendant le montage.

II.7. Montage

Elle est réalisée sous une hotte aspirante et consiste à fixer une lamelle couvre objet sur la lame préalablement traitée avec quelques gouttes de résine synthétique, l'Eukitt, afin de protéger la coupe de la dégradation. Il est à noter qu'il faut éviter tout bulle d'air qui pourrait gêner la lecture au microscope.

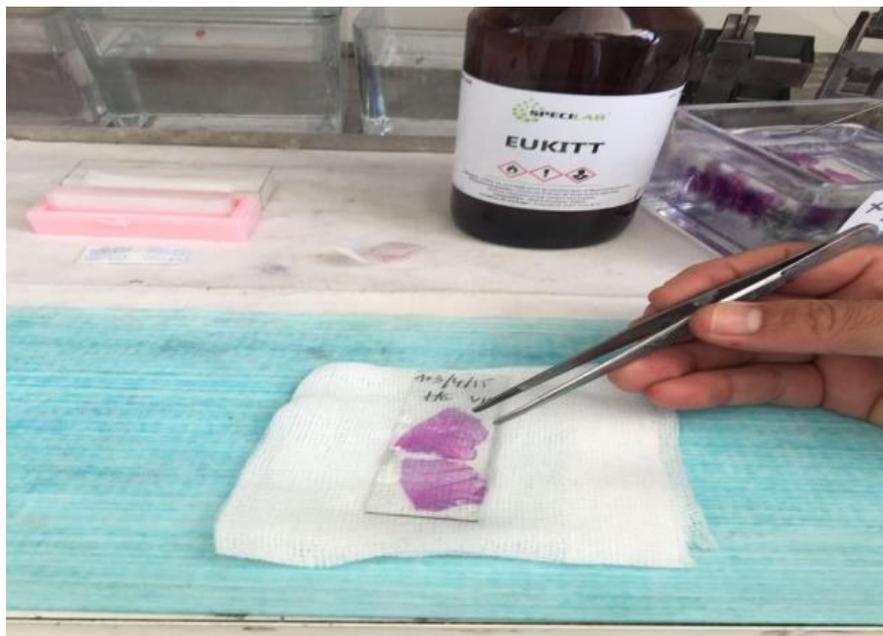


Figure 15 : Montage de lamelle sur la lame

III. L'hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* (HIS) est une technique de laboratoire ayant pour but de localiser des cibles d'acide nucléique mono-brin spécifiques sur une coupe histologique de tissu ou des cellules fixées. Pour cela on utilise une petite séquence complémentaire à la cible appelée sonde.

Il existe **3 types d'hybridation *in situ*** qui se différencient par le marquage de la sonde utilisé pour visualiser les cibles ARN et ADN.

FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) si la sonde est marquée avec un fluorochrome

CISH (Chromogenic *In Situ* Hybridization) si la sonde est marquée avec un chromogène.

SISH (Silver *In Situ* Hybridization) si la sonde est marquée avec des sels d'argents.

Ces 3 types d'HIS sont basés sur le même principe mais les caractéristiques inhérentes à chaque méthode de détection font que la FISH et la CISH sont destinées à des applications très distinctes. De plus, les instruments utilisés pour visualiser les résultats ne sont pas les mêmes en fonction de la méthode utilisée : microscopie à fond clair pour la CISH/ SISH et microscopie à fluorescence pour la FISH.

La méthode utilisée pour notre travail est CISH

III.1. Principe de cette technique

La technique d'hybridation chromogénique *in situ* (CISH) permet la détection et la visualisation de séquences d'acides nucléiques spécifiques dans des préparations cellulaires. Les fragments de nucléotides marqués par des haptènes, appelés sondes CISH, et leurs séquences cibles complémentaires dans les préparations sont codénaturés et ensuite hybridés pendant l'hybridation. Les fragments de sondes non spécifiques et non liés sont éliminés par des étapes de lavage stringent. La formation de duplex de la sonde marquée peut être visualisée en utilisant des anticorps primaires non marqués (Zyto Dot), qui sont détectés par des anticorps secondaires (ZytoDot) polymérisés conjugués à une enzyme. La réaction enzymatique avec les substrats chromogènes conduit à la formation de précipités colorés. Après avoir contre-coloré le noyau avec un colorant nucléaire, les fragments de sonde hybridés sont visualisés au microscope optique.

Les avantages du CISH sont :

- Observation simultanée de la morphologie des tissus et des signaux CISH
- Interprétation rapide et facile des résultats comparables à l'IHC
- Conservation des lames à température ambiante
- Les signaux CISH sont permanents
- Aucun microscope à fluorescence coûteux nécessaire

III.2. Prétraitement

- Préparer des sections 3 à 5 um.
- Utiliser des lames de microscope à charge positive (silanisé) pour avoir une force d'attraction des fragments.
- Incuber les lames pendant 10 minutes à 70°C dans la plaque chauffante (Déparaffinage partiel). Puis dans l'étuve pour le séchage des lames.
- Incuber dans 3 bains de xylène pendant 10 minutes pour chacun (déparaffinage complète).
- Réhydratation dans 3 bains d'éthanol par ordre décroissant 100%,90%,70%
- Localisation de l'endroit étudié par un Pen de diamant
- Le blocage de l'activité des peroxydases endogènes par la peroxydase d'hydrogène (H₂O₂) à 3% pendant 5 minutes.
- Lavages 2 fois chaque fois 1 minute dans l'eau distillée TA.

III.3. Digestion

- Incuber 15 minutes dans le PT2-Solution EDTA dans le bain marié à 95°C.
- Laver 2 fois (2minutes) dans une température ambiante de l'eau distillée pour éviter le choc thermique.
- La digestion avec un enzyme la pepsine dans une chambre humide à 35°C (l'hybridizer) pendant 45 seconds.
- Rinçage avec l'eau distillée TA (2minutes).
- Déshydratation avec l'éthanol dans ordre croissant 70%-90%-100% (1minute chacun)
- Séchées à l'air

III.4. Sonde

- On ajoute des gouttes de la sonde MYCN (30ul).
- Fixer la lamelle sur une lame avec une colle spécifique le fixogume.

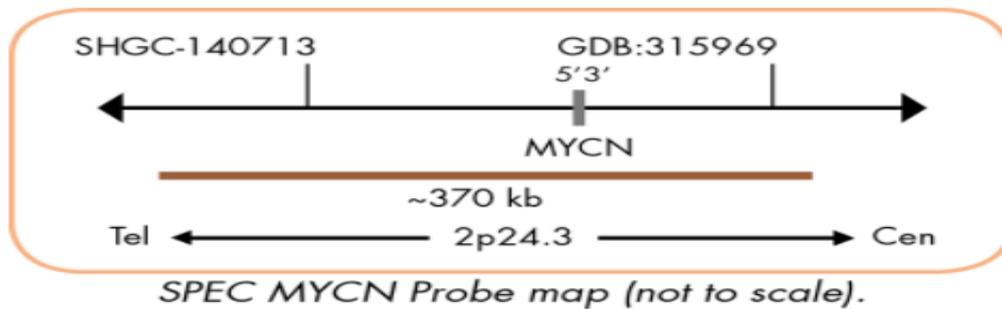


Figure 16: Sonde NMYC

ZYTO VISION MOLECULAR DIAGNOSTICS SIMPLIFIED. « Zyto Dot de SPEC MYCN Probe »

III.5. Dénaturation

- Mettre les lames dans l'hybridizer pendant 5 minutes à 80°C.

III.6. Hybridation

- Mettre les lames dans l'hybridizer pendant 16h dans une température ambiante à 37°C.

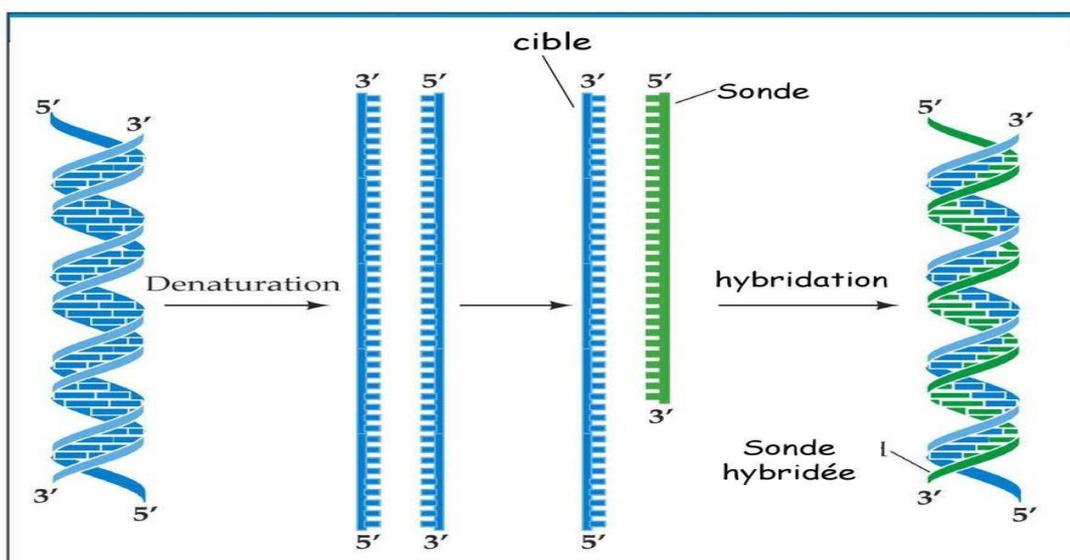


Figure 17: Schéma de dénaturation et d'hybridation d'ADN

DOCPLOYER. « POPULATION D'ADN COMPLEXE - ADN génomique ou - copie d'ARNm = CDNA »

III.7. Post traitement

- Préparer la solution de rinçage EDTA (carbonate sulfate sodium), puis laver les lames pendant 5 minutes à 75°C pour le découlement de la lamelle.
- Laver 2 fois dans l'eau distillée en 2 min pour chacun à température ambiante.
- Laver par Wash Buffer TBS à température ambiante.
- Appliquer 3-4 gouttes le 1^{er} anticorps AB14 pendant 15 minutes à 37°C.
- Laver 3 fois dans Wash Buffer TBS en 1 min pour chacun à température ambiante.
- Appliqué 3-4 gouttes le 2^{ème} anticorps AB13 pendant 15 minutes à 37°C.
- Laver 3 fois dans Wash Buffer TBS en 1 min pour chacun à température ambiante.
- Appliquer le HRP-green (3-4 gouttes par lame) pendant 18 minutes à 37°C, pour la révélation.
- Rinçage a l'eau distillé 2 fois et 2 minutes pour chacun à température ambiante.
- Appliqué une contre coloration CS2 (bleu nucléaire) pendant 1 minutes.
- Rinçage a l'eau de robinet, puis sécher par l'éthanol pure 3 fois pendant 30 second pour chacun, puis 2 fois dans le xylène pendant 30 second.
- Montage de lamelle par Ekit alcoolique puis la lecture.

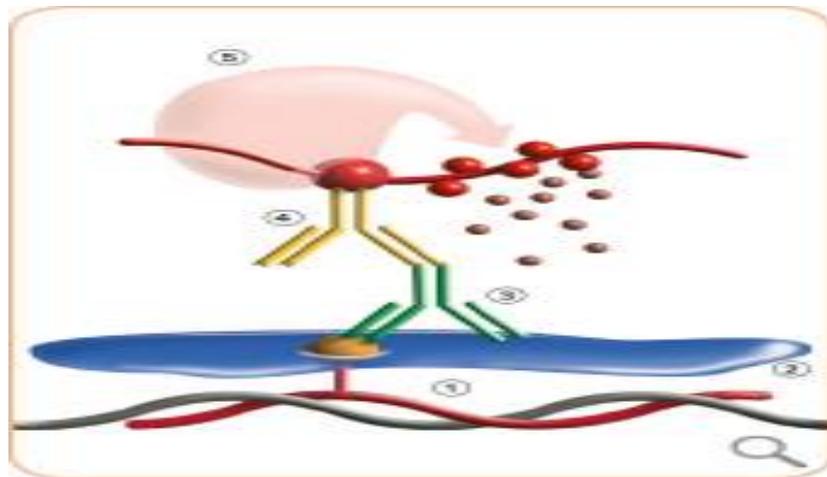


Figure 18: Principe de CISH monocolor pour la détection des altérations génomiques
 ZYTO VISION MOLECULAR DIAGNSOTICS SIMPLIFIED. « Zyto Dot 2C Products for
 CISH analysis »

CISH utilise des sondes marquées à la digoxigénine ⁽¹⁾ qui sont après le blocage ⁽²⁾ détectées à l'aide d'un anticorps de souris anti-digoxigénine ⁽³⁾. Cet anticorps est détecté par un anticorps polymérisé HRP-Chèvre-anti-souris ⁽⁴⁾. La réaction enzymatique du DAB conduit à la formation de forts signaux bruns ⁽⁵⁾ permanents qui peuvent être visualisés par microscopie optique.

CHAPITRE

II

I. Résultat

I.1. Etude statistique

a. Répartition selon le sexe

Parmi les 20 cas étudiés, il y'a 8 garçons et 12 filles. Le sexe ratio M/F est de 0.66 (Figure 19).

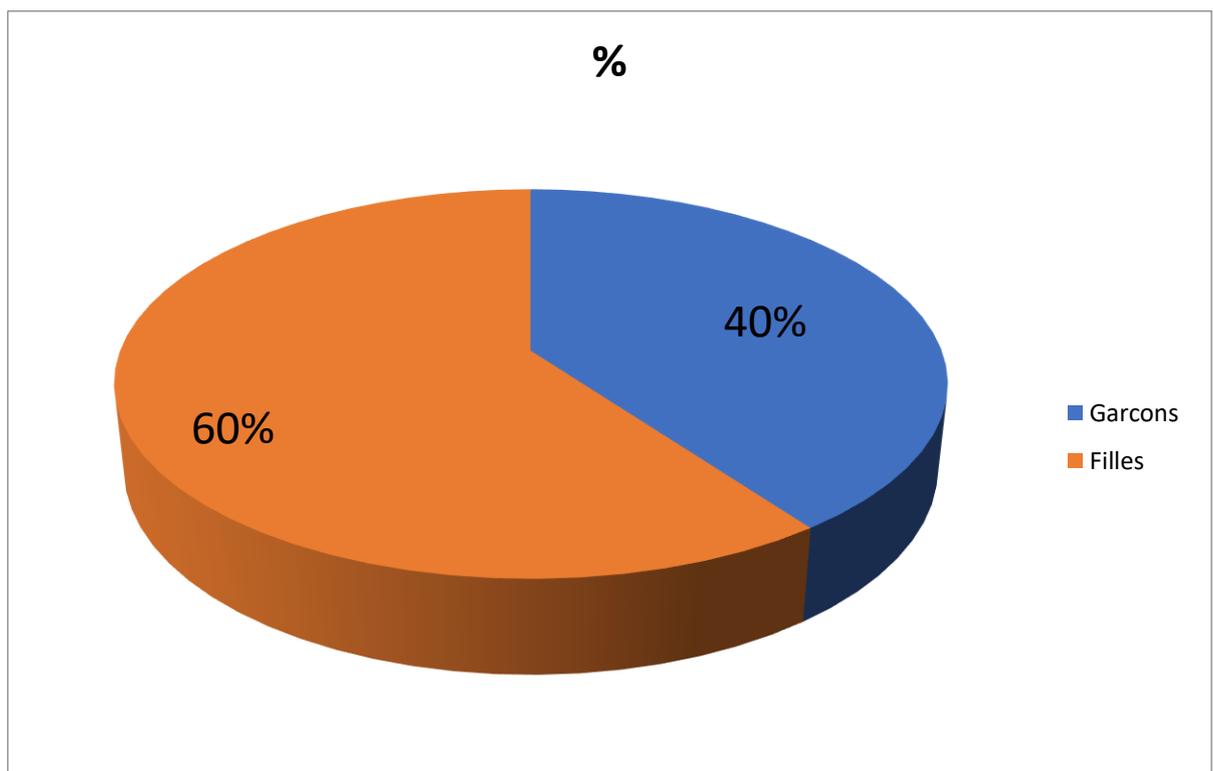


Figure 19 : Répartition de NB selon le sexe

Les résultats obtenus sur 20 patients présentés dans un diagramme circulaire montrent la répartition de NB selon le sexe. On observe que les filles sont plus touchées que les garçons avec un pourcentage 60% chez les filles et 40% chez les garçons, et un ratio M/F est de 0.66 (ANNEXE 5).

b. Répartition selon l'âge

L'âge des patients varie entre 2 mois et 14 ans ; avec un âge moyen de 8 ans. La tranche de l'âge comprise entre 0-1 et >6 ans était la plus touchée, soit 30 % des cas (Figure 20).

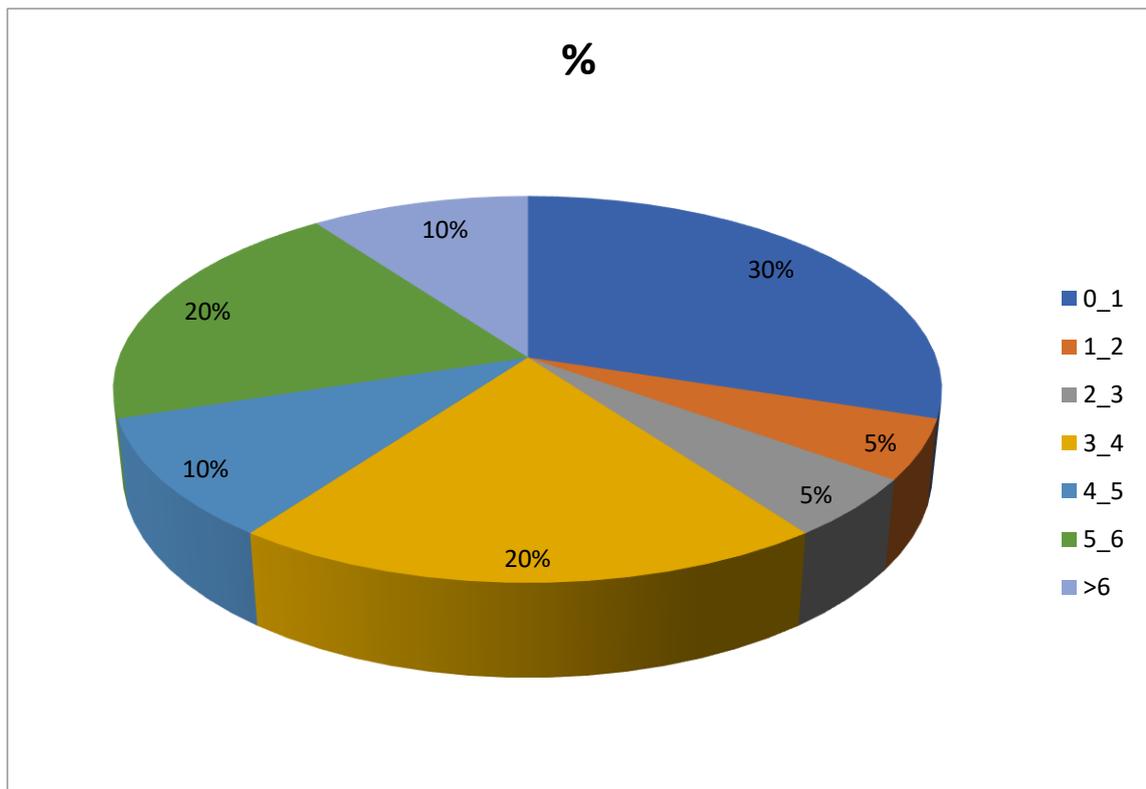


Figure 20 : Répartition de NB selon l'âge

Ce diagramme circulaire montre la répartition de NB selon l'âge. On a remarqué que les enfants de moins de 1 ans sont les plus touchés avec un pourcentage de 30%, que chez les enfants ayant un âge plus. Les patients entre 3 à 4 ans et 5 à 6 ans sont de 20%. Les enfants entre 4 à 5 ans et plus de 6 ans sont de 10 %. Ainsi que entre 1 à 3 ans ayant un pourcentage de 5 % ; avec un âge moyen de 8ans (ANNEXE 5).

C. Répartition selon le siège

Le siège abdominal est le plus fréquent 65% (Figure 21).

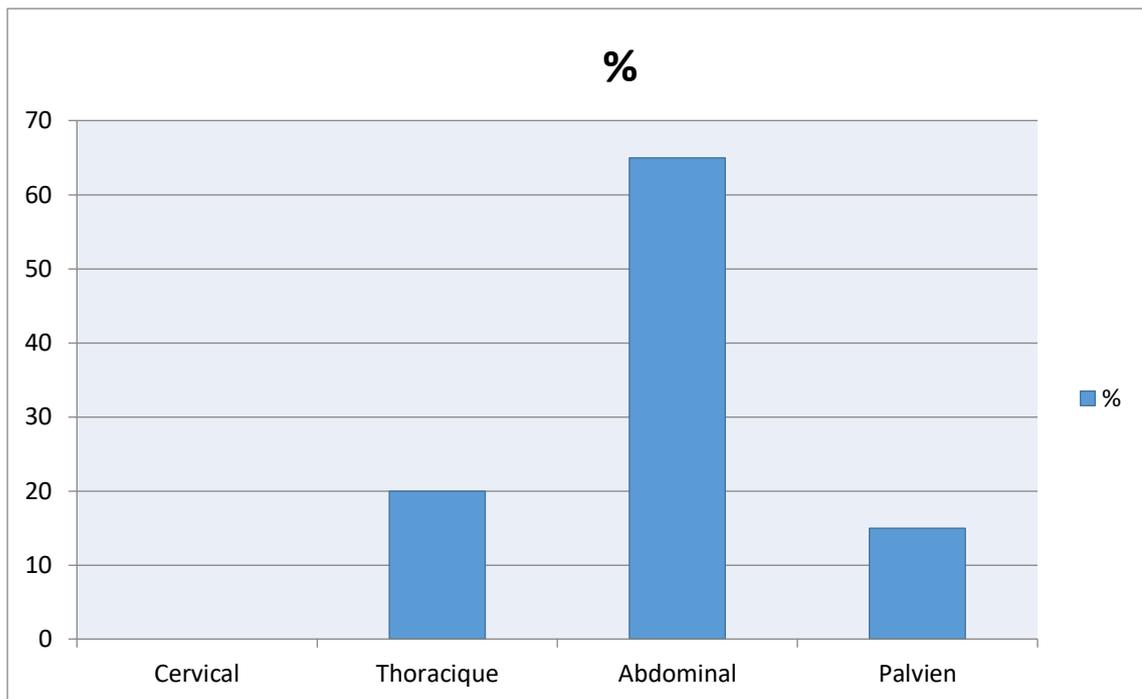


Figure 21: Répartition de NB selon le siège

Cet histogramme présente la répartition de NB selon le siège. On a remarqué que la zone abdominale est la plus dominante de 65%, la zone thoracique présente 20% des cas, et palvien de 15%. Cependant, il y a aucun résultat de zone cervical (ANNEXE5).

d. Répartition selon le niveau d'amplification de NMYC

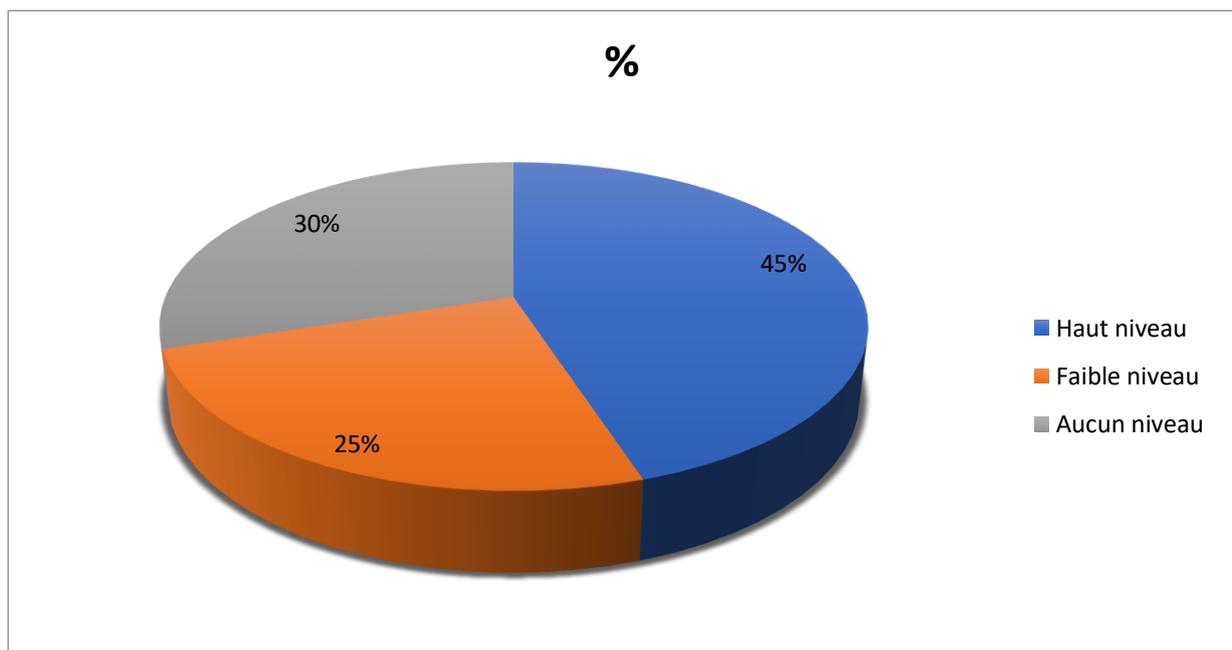


Figure 22 : Répartition des NB selon le niveau d'amplification de MYCN

Ce diagramme circulaire représente la répartition de NB selon le niveau d'amplification. Ces données montrent que les patient présentent un niveau d'amplification élevés de NMYC sont plus dominant avec un pourcentage de 45%. Les patients ayant aucun niveau d'amplification de 30%, et les faiblement amplifiés de 25% (ANNEXE5).

I.2. Aspect microscopique

a. Les glandes surrénales

Les surrénales comportent deux parties distinctes, une glande corticale et une glande médullaire qui sont l'une et l'autre des glandes endocrines de type réticulé. Une capsule d'enveloppe envoie dans le parenchyme de fines travées radiaires accompagnées de capillaires.

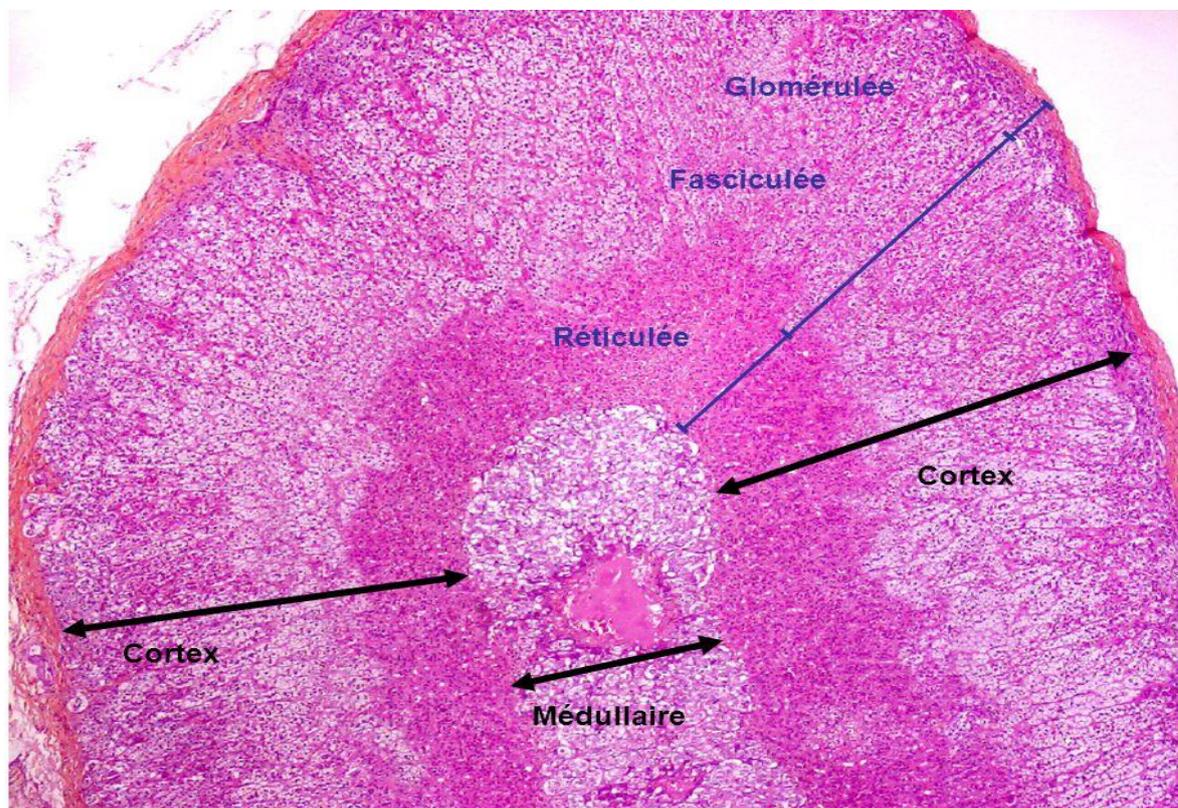


Figure 23 : Photo microscopique d'une coupe histologique de la glande surrénale 100x.

SlidePlayer « les glandes surrénales »

Le cortico-surrénale est elle-même divisée en trois zones :

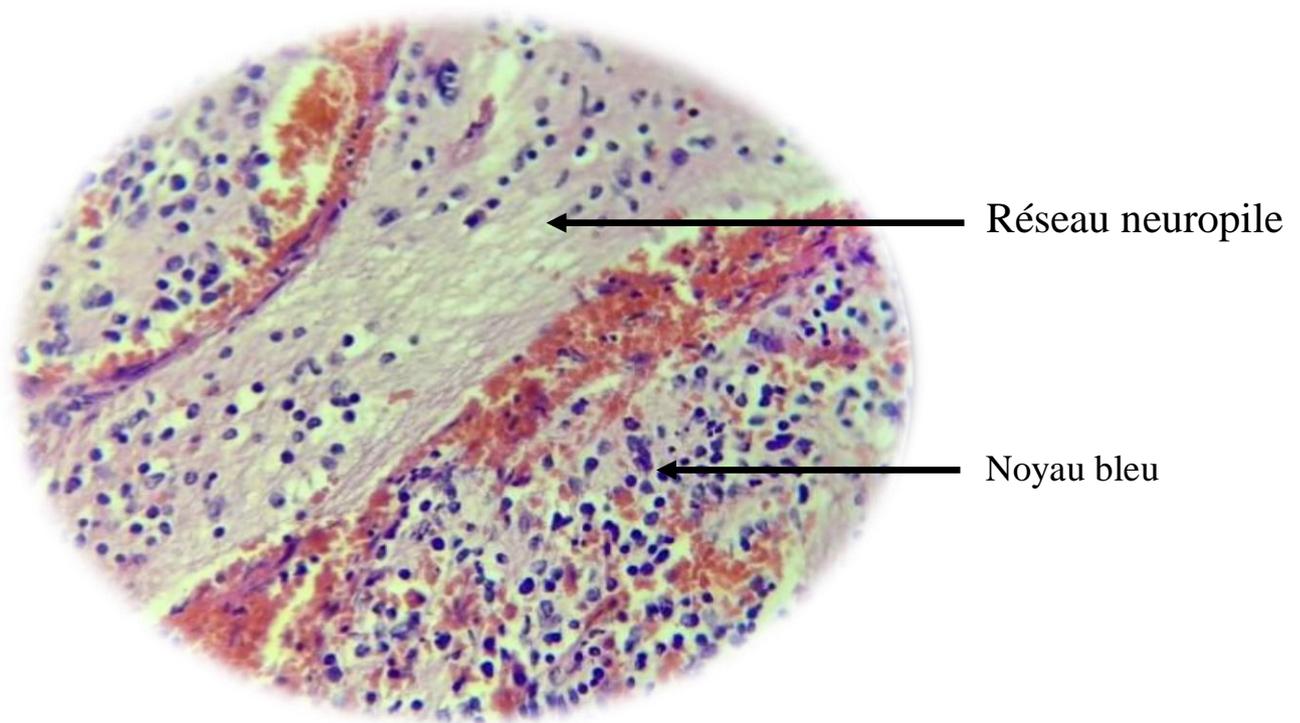
une zone *glomérulée*, la plus externe, où les cordons cellulaires se recourbent en arc sous la capsule ; une zone *fasciculée*, zone moyenne à cordons parallèles entre eux et perpendiculaires à la surface ; dans les deux tiers externes de cette zone, les cellules sont claires et vacuolisées

(spongiocytes) ; une zone *réticulée* plus profonde, constituée de cordons anastomosés séparés par de larges capillaires ; leur coloration est plus soutenue que celle de la fasciculée et on peut observer des pigments jaunes dans la partie la plus interne.

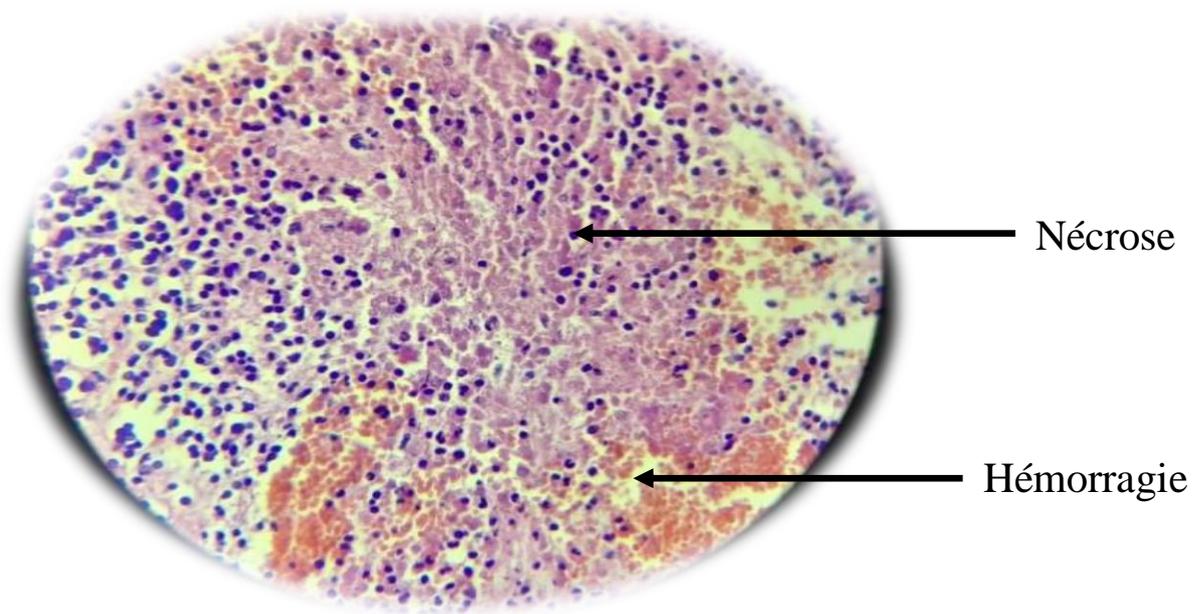
La médullo-surrénale est formée de travées cellulaires irrégulières et anastomosées ; les cellules y sont volumineuses, polyédriques à noyau central ; entre les cordons sont disposés de larges capillaires et sinus veineux à l'origine de la veine surrénale.

b. Coupes histologiques d'un Neuroblastome surrénalien

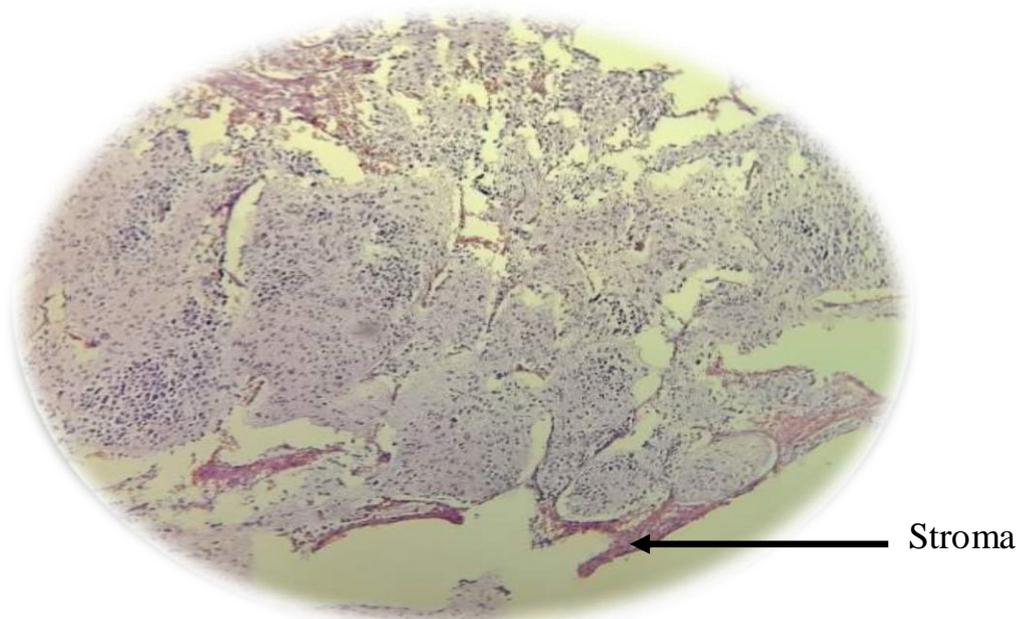
La lecture des lames est effectuée au grossissement (X100, X400, X40). Les coupes sont colorées par hématoxyline éosine.



A. Photo micrographie d'une coupe histologique d'un tissu neuroblastique de la glande surrénale gauche colorée par Hématoxyline Eosine (HE) Gx400, montre un amas cellulaire tumoral composé par des noyaux bleus arrondis et des cellules uniformes avec peu de cytoplasme, et formation de neuropile sous forme d'un réseau grillagé



B. Photo micrographie d'une coupe histologique d'un tissu neuroblastique de la glande surrénale gauche colorée par Hématoxyline Eosine (HE) Gx100, montre la formation d'un foyer Nécrosé correspond à la mort anormale et non programmée des cellules et de cytoplasme suivis par des modifications des éléments extracellulaires, Avec des zones hémorragiques



C. Photo micrographie d'une coupe histologique d'un tissu neuroblastique de la glande surrénale gauche colorée par Hématoxyline Eosine (HE) Gx40, montre un tissu tumoral composée de stroma

qui comprend donc le tissu conjonctif, les vaisseaux, les leucocytes et la matrice extracellulaire et sert de charpente à la tumeur et assure ses apports nutritifs.

Figure 24: Coupes histologiques de neuroblastome

C. Détection de l'amplification MYCN par CISH

A l'aide de la technique d'Hybridation Chromogénique *In Situ*. Sur le microscope photonique, on observe des spots colorés en vert qu'ils sont dans des noyaux coloré en bleu, l'augmentation de nombre de spots définit par l'augmentation de l'amplification de MYCN dans les cellules.

Dans les cellules normales, deux points distincts des signaux par noyau seront observés. Noyaux avec amplification du gène MYCN du chromosome 2 afficher plusieurs points ou de grands groupes de signaux.

-% Cellules hybridés >80%

- Nb des cellules analysées

- Ratio NMYC : Total Spot / nb Ny (nombre des noyaux)

- 1-2 copies : Pas d'amplification
- 3-5 copies : Polysomie probable, Pas d'amplification
- 6-9 copies : Faible niveau d'amplification
- >10 copies : Haut niveau d'amplification



Figure 25 : Photo microscopique montre un statut NMYC hautement amplifié

Tableau IV: Comptage des spots NMYC hautement amplifié dans 30 noyaux

Ny	Gène	Ny	Gène	Ny	Gène
1	12	11	14	21	08
	16		08		15
	12		06		08
	15		13		06
	16		12		18
	09		10		07
	15		06		30
	25		08		09
	30		20		08
10	07	20	25	30	12

Ce tableau représente le nombre de copie NMYC sur 30 noyaux. Chaque noyau composé d'un nombre particulier de copie NMYC. Pour cela on collecte tous les nombres et les divisé sur le nombre de noyau pour calculer la moyenne de copie NMYC.

Tableau V : Résultat d'hybridation de NMYC hautement amplifié

Résultat		
Résultat IHS	-Nb de cellules analysées	30
	-Nb de copies NMYC	400
	-moy copies NMYC	13.33

Ce tableau montre le résultat de 400 copies MYCN sur 30 noyaux. Nous avons obtenue une moyenne de 13.33.

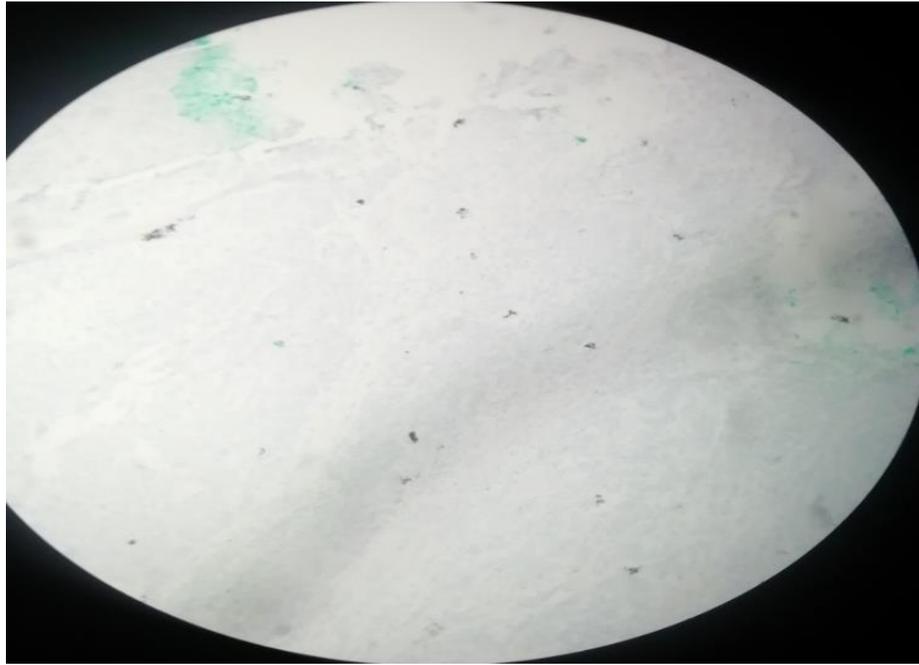


Figure 26 : Photo microscopique montre un statut NMYC faiblement amplifié

Tableau VI : Comptage des spots NMYC faiblement amplifié dans 30 noyaux

Ny	Gène	Ny	Gène	Ny	Gène
1	08	11	03	21	05
	06		06		06
	07		08		05
	05		12		08
	06		10		10
	10		08		12
	08		09		12
	11		08		04
	04		06		08
10	06	20	08	30	08

Ce tableau représente le nombre des copies NMYC sur 30 noyaux. Chaque noyau composé d'un nombre particulier de copie, pour cela on collecte tous les nombres et les divisés sur le nombre des noyaux pour calculer la moyenne de copie NMYC.

Tableau VII : Résultat d'hybridation de NMYC faiblement amplifié

Résultats		
Résultat IHS	-Nb de cellules analysées	30
	-Nb de copies NMYC	227
	-moy copies NMYC	7.56

Ce tableau montre le résultat de 227 copies MYCN sur 30 noyaux. Nous avons obtenue une moyenne de 7.56.

III. Discussion

Les neuroblastomes sont des tumeurs neuroblastiques malignes du système nerveux sympathique, développés à partir des cellules de la crête neurale. Les plus fréquentes parmi les tumeurs solides extra-crâniennes de l'enfant (Pérel et *al*, 2004).

Cependant l'analyse moléculaire des neuroblastomes a permis, au cours des 20 dernières années, d'identifier un grand nombre de remaniements qui sous-tendent l'extrême variabilité évolutive. Parmi ces remaniements, l'amplification de l'oncogène MYCN est le facteur pronostique majeur, premier exemple d'un marqueur génique influençant directement le projet thérapeutique en oncologie pédiatrique (Pérel et *al*, 2004).

Dans ce travail, 20 enfants atteints de NB ont été pris en charge au niveau de laboratoire d'anatomopathologie CHU Douera, entre 1 janvier 2020 et 15 mars 2021.

Selon Michalowski et *al*, (1999), La localisation abdominale est plus fréquente 77 % des cas. Ce qui est similaire à nos résultats.

Selon Park et *al* (2008), il existe une prédominance chez les garçons et le sexe ratio global M/F est de 1,2. Cependant, nos résultats ne sont pas similaires ; la plus fréquent chez les filles que les garçons de ration M/F 0.66.

Selon Tonbary et *al*, (2015), la tranche de l'âge la plus touchée est plus de 1 an, par contre nos résultats montrent que les enfants de moins de 1 an sont les plus touchés.

Dans notre étude, la plupart des Neuroblastomes surviennent au niveau de la glande surrénale (65%). Selon Michalowski et *al*, (1999), la majorité des tumeurs était de siège surrénalien (20/52 = 38 %).

Selon Tonbary et *al*, (2015), les glandes surrénales étaient le site tumoral primaire le plus fréquent (72,7 %). La majorité des patients (76,7%) avaient une tumeur de stade IV.

Selon Bhargava et *al*, (2005), Aucun niveau d'amplification MYCN est la plus fréquent de 66,6%, les hautement amplifiés de 28,4% et les faiblement amplifiés de 3 %. Quant à nos résultats montre qu'il y'a une augmentation de niveau d'amplification MYCN chez les patients atteints de neuroblastomes que faible niveau et aucun niveau d'amplification.

Selon Korja et *al*, (2005), les enfants atteints de neuroblastome présentent des copies NMYC hautement amplifiées sont les plus fréquents. Détections par la technique CISH. Ce qui est similaire à nos résultats.

D'après Schwab et *al*, (1984), L'amplification de l'oncogène MYCN résultant en l'apparition de dix à plus de cent copies du gène est observée dans environ un tiers des cas de neuroblastome.

La localisation abdominale est la plus fréquente (65 % des cas), au niveau des surrénales. Les localisations thoraciques, cervicales et pelviennes sont plus rares. Les localisations thoraciques et cervicales concernent plus souvent les nourrissons, selon (Janoueix et *al*, 2009).

D'après Brosinski et *al*, (2012), qu'il montre que la tumeur neuroblastique moins différenciée présente des architectes lobulaires avec des arrangements de recette et large champ de nécrose. Nos résultats sont similaires.

Selon Brosinski et *al*, (2012), les tumeurs neuroblastiques bien différenciées présentent une quantité variable de stroma fibrovasculaire et moins différenciées ne présentent pas de stroma. Cependant, Nos résultats montrent que les tumeurs peu différenciées peu présentent une quantité de stroma.

Les Tumeurs Neuroblastiques sont des tumeurs très polymorphes. Malgré d'importants progrès diagnostiques et thérapeutiques, elles restent des tumeurs graves dans certaines formes, justifiant une poursuite de la recherche scientifique pour améliorer la prise en charge des patients.

D'après les résultats obtenus dans le service d'anatomopathologie de CHU Douera. Nous avons constaté que :

Selon les études anatomopathologiques, la prédominance des tumeurs neuroblastiques abdominales avec un pourcentage de 65%. Les neuroblastomes (NB) constitués par des petites cellules dotées de gros noyau et peu de cytoplasme. Ainsi que les neuroblastomes (NB) peu différenciés caractérisés par un tissu peu nécrosé et peu de stroma.

La glande surrénale compose de 2 parties distinctes, Le cortico-surrénale qui est formé par 3 zones ; une zone glomérulée, une zone fasciculée et une zone réticulée. Et La médullo-surrénale.

Selon les études en biologie moléculaire, grâce à la technique d'hybridation chromogénique in situ (CISH), les neuroblastomes (NB) caractérisés par l'amplification de gène NMYC. L'augmentation de nombre de spots définit par l'augmentation de l'amplification de MYCN dans les cellules. On parle d'amplification quand on retrouve plus de 10 copies par génome haploïde.

A travers cette étude, selon le taux d'amplification NMYC le médecin propose le bon traitement qui peut traiter les enfants atteints de neuroblastome. Et diminuer ainsi les séquelles des traitements chirurgicaux trop précocement entrepris chez les jeunes patients concernés.

Les données accumulées montrent qu'une expression élevée de MYCN peut agir comme un moteur oncogène unique dans le neuroblastome et les mécanismes par lesquels MYCN induit une transformation néoplasique et fortement prédictive d'un mauvais pronostic chez les enfants plus âgés atteints de neuroblastome, mais pas chez les nourrissons. Les résultats aident à expliquer la controverse dans la littérature sur la valeur pronostique de l'expression du gène MYCN et mettent en évidence la biologie différente du neuroblastome qui se présente chez les nourrissons et les enfants plus âgés.

Dans les perspectives d'avenir, nous souhaiterions faire des études en Biologie moléculaire et génétique afin de trouver les traitements sur la tumeur neuroblastique pour diminuer le taux de l'amplification de gène MYCN ainsi que la métastase.

Références bibliographique

- **A.M. Davidoff (2012)**, Neuroblastoma, *Semin. Pediatr. Surg.* 21:2–14, <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2011.10.009>
- **Adhikary, S. & Eilers, M (2005)**. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 635–645
- **AL-TONBARY, Y., BADR, M., MANSOUR, A., EL SAFY, U., SAEED, S., HASSAN, T., ... DARWISH, A. (2015)**. Clinico-epidemiology of neuroblastoma in north east Egypt: A 5-year multicenter study. *Oncology Letters*, 10(2), 1054–1062. doi:10.3892/ol.2015.3335
- **Bernardi B, Gambini C, Haupt R, Granata C, Rizzo A, Conte M, Tonini GP, Bianchi M, Giuliano M, Luksch R, Prete A, Viscardi E, Garaventa A, Sementa AR, Bruzzi P, Angelini P (2008)**. Retrospective study of childhood ganglioneuroma. *J Clin Oncol.* 26:1710–6.
- **Bernards, R.; Dessain, S.K.; Weinberg, R.A (1986)**. N-myc amplification causes down-modulation of MHC class I antigen expression in neuroblastoma. *Cell*, 47:667–674.
- **Betancur, P., Bronner-Fraser, M., & Sauka-Spengler, T. (2010)**. *Assembling Neural Crest Regulatory Circuits into a Gene Regulatory Network. Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26(1), 581–603. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113245
- **Bjerke L, Mackay A, Nandhabalan M, Burford A, Jury A, Popov S, et al 2013**. Histone H3.3. mutations drive pediatric glioblastoma through upregulation of MYCN. *Cancer Discov*;3:512–9.
- **Blavier, L., Yang, R.-M. and DeClerck, Y. A. (2020)** ‘The Tumor Microenvironment in Neuroblastoma: New Players, New Mechanisms of Interaction and New Perspectives’, *Cancers*, 12(10), p. E2912. doi: [10.3390/cancers12102912](https://doi.org/10.3390/cancers12102912)
- **Blavier, Laurence, Ren-Ming Yang, et Yves A (2020)**. DeClerck. « The Tumor Microenvironment in Neuroblastoma: New Players, New Mechanisms of Interaction and New Perspectives ». *Cancers* 12, n° 10 (10 octobre 2020): E2912. <https://doi.org/10.3390/cancers12102912>.
- **Boon K et al. (2001)** N-MYC enhances the expression of a largeset of genes functioning in ribosome biogenesis and pro tein synthesis. *EMBO J* 20:1383–1393
- **Borriello L, R.C. Seeger, S. Asgharzadeh, Y.A (2015)**. DeClerck, More than the genes, the tumor microenvironment in neuroblastoma, *Cancer Lett.* <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.11.017>.
- **Brodeur GM (2003)**, Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003;3:203–16.
- **Brodeur GM (2003)**. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*; 3(3): 203-16

Références bibliographique

- **Brodeur GM (2003).** Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*, 3:203-216
- **Bronner ME, Simões-Costa M (2016).** The neural crest migrating into the twenty-first century. *Curr Top Dev Biol*. 116:115–34.
- **Buck, G.M., Michalek, A.M., Chen, C.J., Nasca, P.C., Baptiste, M.S., 2001.** Perinatal factors and risk of neuroblastoma. *Paediatr Perinat Epidemiol* 15, 47–53. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3016.2001.00307.x>
- **Buckley PG, Alcock L, Bryan K, Bray I, Schulte JH, Schramm A, et al (2010).** Chromosomal and microRNA expression patterns reveal biologically distinct subgroups of 11q- neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 16:2971-8.
- **Campagna, G., Rosenfeld, E., Foster, J., Vasudevan, S., Nuchtern, J., Kim, E., Commander, S., Naik-Mathuria, B., 2018.** Evolving biopsy techniques for the diagnosis of neuroblastoma in children. *Journal of Pediatric Surgery* 53, 2235–2239. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2018.04.012>
- **Chen L, Iraci N, Gherardi S, Gamble LD, Wood KM, Perini G, et al (2010).** p53 Is a Direct Transcriptional Target of MYCN in Neuroblastoma. *Cancer Res* 70:1377–88. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2598
- **Cheng AJ, Cheng NC, Ford J, Smith J, Murray JE, Flemming C et al. (2007).** Cell lines from MYCN transgenic murine tumours reflect the molecular and biological characteristics of human neuroblastoma. *Eur J Cancer* 43: 1467–1475.
- **Cheung NK, Kushner BH, LaQuaglia M, et al (2001).** N7: A novel multi-modality therapy of high risk neuroblastoma (neuroblastoma) in children diagnosed over 1 year of age. *Med Pediatr Oncol*. 36:227–230
- **Costa, A.; Kieffer, Y.; Scholer-Dahirel, A.; Pelon, F.; Bourachot, B.; Cardon, M.; Sirven, P.; Magagna, I.; Fuhrmann, L.; Bernard, C.; et al (2018).** Fibroblast heterogeneity and immunosuppressive environment in human breast cancer. *Cancer Cell*, 33, 463–479.e10.
- **Cowling, V.H., and Cole, M.D. (2006)** Mechanism of transcriptional activation by the Myc oncoproteins. *Semin.Cancer Biol*. 16, 242-252.
- **Dasilva; Oliveir; et al (2013).** Analyse chromosomique: Applicabilité clinique aux cancers du cerveau. *Gestion clinique et nouvelles stratégies thérapeutiques en évolution pour les patients atteints de tumeurs cérébrales*. doi: 10.5772/52354
- **Dang, C. V. et al ; (2006).** The c-Myc target gene network. *Semin. Cancer Biol*. 16, 253–264
- **Dang, C.V., 2012.** MYC on the Path to Cancer. *Cell* 149, 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.003>

Références bibliographique

- **Davis, F.G., McCarthy, B.J., Freels, S., Kupelian, V., Bondy, M.L., 1999.** The conditional probability of survival of patients with primary malignant brain tumors. *Cancer* 85, 485–491. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19990115\)85:2<485::AID-CNCR29>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19990115)85:2<485::AID-CNCR29>3.0.CO;2-L)
- **Deyell RJ, Attiyeh EF (2011).** Advances in the understanding of constitutional and somatic genomic alterations in neuroblastoma. *Cancer Genet.* 204:113-21.
- **DOCPLAYER.** « POPULATION D ADN COMPLEXE - ADN génomique ou - copie d ARNm = CDNA ». (<https://docplayer.fr/3787763-Population-d-adn-complexe-adn-genomique-ou-copie-d-arnm-cdna.html>).
- **Eilers M, Eisenman RN 2008.** Myc's broad reach. *Genes Dev*;22:2755–66
- **Westermarck, U.K., Wilhelm, M., Frenzel, A., Henriksson, M.A., 2011.** The MYCN oncogene and differentiation in neuroblastoma. *Seminars in Cancer Biology*,
- **Erisman MD, Rothberg PG, Diehl RE, Morse CC, Spandorfer JM and Astrin SM. (1985).** *Mol Cell Biol*, 5, 1969-1976.
- **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.
- **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.
- **Fu X, Wu S, Li B, Xu Y, Liu J. (2005).** Functions of p53 in pluripotent stem cells. *Protein Cell* (2005).11:71–8. doi: 10.1007/s1323
- **Furlan A, Dyachuk V, Kastriti ME, et al (2017).** Multipotent peripheral glial cells generate neuroendocrine cells of the adrenal medulla. *Science.* 357:eal3753. <https://doi.org/10.1126/science.aal3753>.
- **G. Gatta, L. Botta, S. Rossi, T. Aareleid, M. Bielska-Lasota, J. Clavel, N. Dimitrova, Z. Jakab, P. Kaatsch, B. Lacour, S. Mallone, R. Marcos-Gragera, P. Minicozzi, M.J. Sánchez M. Sant M. Santaquilani C. Stiller A. Tavilla, A. Trama O. Visser Peris-Bonet (2014),** Childhood cancer survival in Europe 1999-2007: results of EUROCORE-5-a population-based study, *Lancet Oncol.* 15:35–47, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70548-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70548-5)
- **SlidePlayer** « les glandes surrénales », (<https://slideplayer.fr/slide/5077201/>)
- **Garson JA, McIntyre PG, Kemshead JT.** N-myc amplification in malignant astrocytoma. *Lancet* 1985;2:718–9.
- **Gore L, Trippett TM, Katzenstein H, Boklan J, Narendran A, Smith A, et al (2013).** A multicenter, first-in-pediatrics, phase 1, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of ridaforolimus in patients with refractory solid tumors. *Clin Cancer Res*; 19:3649–58.

Références bibliographique

- **Groves AK, LaBonne C (2014).** Établissement de limites appropriées : destin, structuration et compétence à la frontière de la plaque neurale. *Dev Biol* 389 :2-12. [10.1016/j.ydbio.2013.11.027](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.11.027)
- **Gu L, Zhang H, He J, Li J, Huang M, Zhou M (2012).** MDM2 regulates MYCN mRNA stabilization and translation in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 31:1342–53. doi: [10.1038/onc.2011.343](https://doi.org/10.1038/onc.2011.343)
- **Gustafson, W. C. and Weiss, W. A. (2010)** ‘Myc proteins as therapeutic targets’, *Oncogene*, 29(9), pp. 1249–1259. doi: [10.1038/onc.2009.512](https://doi.org/10.1038/onc.2009.512).
- **Gustafson, W. C. and Weiss, W. A. (2010)** ‘Myc proteins as therapeutic targets’, *Oncogene*, 29(9), pp. 1249–1259. doi: [10.1038/onc.2009.512](https://doi.org/10.1038/onc.2009.512).
- **Gustafson, W. C., et W. A. Weiss (2010).** « Myc Proteins as Therapeutic Targets ». *Oncogene* 29, n° 9 (mars 2010): 1249-59. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.512>.
- **Hamrick, S.E., Olshan, A.F., Neglia, J.P., Pollock, B.H., 2001.** Association of pregnancy history and birth characteristics with neuroblastoma: a report from the Children’s Cancer Group and the Pediatric Oncology Group. *Paediatr Perinat Epidemiol* 15, 328–337. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3016.2001.0376a.x>
- **Herbst, A., Hemann, M.T., Tworkowski, 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.
- **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.
- **Jain AK, Barton MC (2018).** p53 : emerging roles in stem cells, development and beyond. *Development* 145. doi: [10.1242/dev.158360](https://doi.org/10.1242/dev.158360) 8-019-00665-x
- **Janoueix-Lerosey, I., Brugières, L., Delattre, O., 2009.** Nouvelles données sur l’origine génétique du neuroblastome 5.
- **Janoueix-Lerosey, I., Lequin, D., Brugières, L., Ribeiro, A., de Pontual, L., Combaret, V., Raynal, V., Puisieux, A., Schleiermacher, G., Pierron, G., Valteau-Couanet, D., Frebourg, T., Michon, J., Lyonnet, S., Amiel, J., Delattre, O., 2008.** Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 455, 967–970. <https://doi.org/10.1038/nature07398>
- **Jessen K, Wang S, Kessler L, Guo X, Kucharski J, Staunton J, et al (2009).** INK128 is a potent and selective TORC1/2 inhibitor with broad oral antitumor activity. *Mol Cancer Ther*; 8:B148
- **K.J. Cheung, A.J. Ewald (2016).** A collective route to metastasis: seeding by tumor cell clusters, *Science* 352:167–169, <https://doi.org/10.1126/science.aaf6546>.

Références bibliographique

- **K.W. Pajtler, E. Mahlow, A. Odersky, S. Lindner, H. Stephan, I. Bendix, A. Eggert, A. Schramm, J.H (2014).** Schulte, Neuroblastoma in dialog with its stroma: NTRK1 is a regulator of cellular cross-talk with Schwann cells, *Oncotarget* 5:11180–11192, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2611>
- **Kalluri, R (2016).** The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 16: 582–598.
- **Kawagoe H, Kandilci A, Kranenburg TA, Grosveld GC, 2007.** Overexpression of N-Myc rapidly causes acute myeloid leukemia in mice. *Cancer Res* 67:10677–85.
- **Knecht AK, Bronner-Fraser M (2002).** Induction of the neural crest: a multigene process. *Nat. Rev. Genet.* [Internet]. 3:453–61. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrg819>
- **Korja, M., Finne, J., Salmi, T.T., Kalimo, H., Karikoski, R., Tanner, M., Isola, J., Haapasalo, H., 2005.** Chromogenic in situ hybridization-detected hotspot MYCN amplification associates with Ki-67 expression and inversely with nestin expression in neuroblastomas. *Mod Pathol* 18, 1599–1605. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800462>
- **Kramer, S., Ward, E., Meadows, A.T., Malone, K.E., 1987.** Medical and drug risk factors associated with neuroblastoma: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 78, 797–804.
- **Layer, J.P.; Kronmüller, M.T.; Quast, T.; Boorn-Konijnenberg, D.V.D.; Effern, M.; Hinze, D.; Althoff, K.; Schramm, A.; Westermann, F.; Peifer, M.; et al (2017).** Amplification of N-Myc is associated with a T-cell-poor microenvironment in metastatic neuroblastoma restraining interferon pathway activity and chemokine expression. *OncoImmunology*, 6, e1320626.
- **Lee WH, Murphree AL, Benedict WF, 1984.** Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma. *Nature*;309:458–60
- **Lenardo, M.; Rustgi, A.; Schievella, A.; Bernards, R (1989).** Suppression of MHC class I gene expression by N-myc through enhancer inactivation. *EMBO J.* 8: 3351–3355.
- **Ishan AF, Bunin GR (2000).** Epidemiology of neuroblastoma. In: Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA (eds) *Neuroblastoma*. Elsevier, Amsterdam, pp 33–39
- **Mac SM, D’Cunha CA, Farnham PJ (2000)** Direct recruitment of N-MYC to target gene promoters. *Mol Carcinogr* 29:76–86
- **Malis J., Shimada H, Ed (2013).** Clinical presentation of neuroblastoma. *Neuroblastoma*. InTech.;pp.3-12. Available from: <https://www.intechopen.com/books/neuroblastoma/clinicalpresentation-of-neuroblastoma>
- **Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL (2007)** Neuroblastoma. *Lancet* 369:2106–2120
- **Maris JM. N Engl J Med (2010);** Recent advances in neuroblastoma. 362(23): 2202-11.

Références bibliographique

- **Maris, J.M., M.D. Hogarty, R. Bagatell, and S.L. Cohn. 2007.** Neuroblastoma. *Lancet*. 369:2106–20.
- **Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, et al (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.
- **Meitar, D.; Crawford, S.E.; Rademaker, A.W.; Cohn, S.L (1996).** Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.*, 14, 405–414.
- **Mobley, B.C.; Kwon, M.; Kraemer, B.R.; Hickman, F.E.; Qiao, J.; Chung, D.H.; Carter, B.D (2015).** Expression of MYCN in multipotent sympathoadrenal progenitors induces proliferation and neural differentiation, but is not sufficient for tumorigenesis. *PLoS ONE*, 10, e0133897.
- **Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, et al (2008).** Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*; 455(7215): 930-5.
- **Mossé, Y.P., Laudenslager, M., Longo, L., Cole, K.A., Wood, A., Attiyeh, E.F., Laquaglia, M.J., Sennett, R., Lynch, J.E., Perri, P., Laureys, G., Speleman, F., Kim, C., Hou, C., Hakonarson, H., Torkamani, A., Schork, N.J., Brodeur, G.M., Tonini, G.P., Rappaport, E., Devoto, M., Maris, J.M., 2008.** Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 455, 930–935. <https://doi.org/10.1038/nature07261>
- **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.
- **Michalowski, M.B., Rubie, H., Michon, J., Montamat, S., Bergeron, C., Coze, C., Perel, Y., Valteau-Couanet, D., Guitard, J., Guys, J.M., Piolat, C., Munzer, C., Plantaz, D., 2004.** Neuroblastomes localisés du nouveau-né : 52 cas traités de 1990 à 1999. *Archives de Pédiatrie* 11, 782–788. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2004.01.020>
- **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., (1989)** Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58,537-544.
- **Northcott, P.A., Jones, D.T.W., Kool, M., Robinson, G.W., Gilbertson, R.J., Cho, Y.-J., Pomeroy, S.L., Korshunov, A., Lichter, P., Taylor, M.D., Pfister, S.M., 2012.** Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nat Rev Cancer* 12, 818–834. <https://doi.org/10.1038/nrc3410>
- **Okamoto C, London WB, Naranjo A, Hogarty MD, Gastier-Foster JM, Look AT, LaQuaglia M, Maris JM, Cohn SL, Matthay KK, Seeger RC, Saji T, Shimada H (2009).** Clinicopathological characteristics of ganglioneuroma and ganglioneuroblastoma: a report from the CCG and COG. *Pediatr Blood Cancer*. 53:563–9.

Références bibliographique

- **Olshan, A.F., Smith, J.C., Bondy, M.L., Neglia, J.P., Pollock, B.H., 2002.** Maternal vitamin use and reduced risk of neuroblastoma. *Epidemiology* 13, 575–580. <https://doi.org/10.1097/00001648-200209000-00014>
- **Opel D, Poremba C, Simon T, Debatin KM, Fulda S (2007).** Activation of Akt predicts poor outcome in neuroblastoma. *Cancer Res*; 67: 735–45
- **Pelengaris, S., Khan, M. & Evan, G; (2002).** c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat. Rev. Cancer* 2, 764–776
- **Peuchmaur M (2004).** [Peripheral neuroblastic tumors: anatomo pathological classification]. *Ann Pathol.* Dec;24(6):556–67
- **Pérel, Y., Valteau-Couanet, D., Michon, J., Lavrand, F., Coze, C., Bergeron, C., Notz, A., Plantaz, D., Chastagner, P., Bernard, F., Thomas, C., Rubie, H., 2004.** Le pronostic du neuroblastome de l'enfant. Méthodes d'étude et utilisation en pratique clinique. *Archives de Pédiatrie* 11, 834–842. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2004.02.022>
- **Peuchmaur, M (2004).** *Les tumeurs neuroblastiques périphériques, classification anatomo-pathologique. Annales de Pathologie*, 24(6), 556-567. doi:10.1016/s0242-6498(04)94018-7
- **Park, J. R., Eggert, A., & Caron, H. (2008).** Neuroblastoma: Biology, Prognosis, and Treatment. *Pediatric Clinics of North America*, 55(1), 97–120. doi:10.1016/j.pcl.2007.10.014
- **Reisman D, Elkind NB, Roy B, Beamon J, Rotter V; (2010).** c-Myc Trans-activates the p53 Promoter through a Required Downstream CACGTG Motif. *Cell Growth Differ* (2010) 4:57–65.
- **R, B., O, O., W, G., Sc, J., B, C., 2005.** Identification of MYCN gene amplification in neuroblastoma using chromogenic in situ hybridization (CISH): an alternative and practical method. *Diagn Mol Pathol* 14, 72–76. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000149878.78117.ff>
- **Schenone S, Brullo C, Musumeci F, Radi M, Botta M (2011).** ATP-competitive inhibitors of mTOR: an update. *Curr Med Chem*; 18:2995–3014.
- **Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, et al.** Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*. 1983 Sep 15;305(5931):245–8.
- **Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, et al.** Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*. 1983 Sep 15;305(5931):245–8.
- **Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F (2003).** Neuro blastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol*, 4:472-480.

Références bibliographique

- 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.
- Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B (1999). Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer*. 1999 Jul 15;86(2):349–63
- Shimada, H.; Stram, D.O.; Chatten, J.; Joshi, V.V.; Hachitanda, Y.; Brodeur, G.M.; Lukens, J.N.; Matthay, K.K.; Seeger, R.C (1995). Identification of subsets of neuroblastomas by combined histopathologic and N-myc analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 1470–1476.
- Stark, D.D., Moss, A.A., Brasch, R.C., deLorimier, A.A., Albin, A.R., London, D.A., Gooding, C.A., 1983. Neuroblastoma: diagnostic imaging and staging. *Radiology* 148, 101–105. <https://doi.org/10.1148/radiology.148.1.6856817>
- Sharp, S.E., Gelfand, M.J., Shulkin, B.L., 2011. Pediatrics: Diagnosis of Neuroblastoma. *Seminars in Nuclear Medicine, MIBG in Diagnosis and Therapy* 41, 345–353. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2011.05.001>
- Simoes-Costa M, Bronner ME (2015). Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development* [Internet]. 142:242–57. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.105445>
- Strenger, V., Kerbl, R., Dornbusch, H.J., Ladenstein, R., Ambros, P.F., Ambros, I.M., Urban, C., 2007. Diagnostic and prognostic impact of urinary catecholamines in neuroblastoma patients. *Pediatric Blood & Cancer* 48, 504–509. <https://doi.org/10.1002/pbc.20888>
- Silber, J.H., Evans, A.E., Fridman, M., 1991. Models to Predict Outcome from Childhood Neuroblastoma: The Role of Serum Ferritin and Tumor Histology. *Cancer Res* 51, 1426–1433.
- Slack A, Chen Z, Tonelli R, Pule M, Hunt L, Pession A, et al; (2005). The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:731–6. doi: 10.1073/pnas.0405495102
- Spaeth, E.L.; Dembinski, J.L.; Sasser, A.K.; Watson, K.; Klopp, A.; Hall, B.; Andreeff, M.; Marini, F (2009). Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS ONE*, 4, e4992. [CrossRef]
- Swartling FJ, Savov V, Persson AI, Chen J, Hackett CS, Northcott PA, et al 2012. Distinct neural stem cell populations give rise to disparate brain tumors in response to N-MYC. *Cancer Cell*;21:601–13.
- Tomolonis JA, Agarwal S, Shohet JM (2018). Pathogenèse du neuroblastome : dérégulation du développement de la crête neurale embryonnaire . *Cell Tissue Res* 372: 245–62. 10.1007/s00441-017-2747-0

Références bibliographique

- **Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I, et al (2004).** Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet*; 74(4): 761-4
- **Trochet, D., O'Brien, L.M., Gozal, D., Trang, H., Nordenskjöld, A., Laudier, B., Svensson, P.-J., Uhrig, S., Cole, T., Munnich, A., Gaultier, C., Lyonnet, S., Amiel, J., 2005.** PHOX2B Genotype Allows for Prediction of Tumor Risk in Congenital Central Hypoventilation Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 76, 421–426. <https://doi.org/10.1086/428366>
- **V.P. Tolbert, K.K. Matthay (2018).** Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment, *Cell Tissue Res.* 372:195–209, <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2821-2>.
- **Van Noesel MM, Versteeg R.** Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic “danse macabre.” *Gene.* 2004 Jan 21;325:1–15.
- **Vandepoele, K., Andries, V., Roy, N.V., Staes, K., Vandesompele, J., Laureys, G., Smet, E.D., Berx, G., Speleman, F., Roy, F. van, 2008.** A Constitutional Translocation t(1;17)(p36.2;q11.2) in a Neuroblastoma Patient Disrupts the Human NBP1 and ACCN1 Genes. *PLOS ONE* 3, e2207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002207>
- **Wang, L.L.; Teshiba, R.; Ikegaki, N.; Tang, X.X.; Naranjo, A.; London, W.B.; Hogarty, M.D.; Gastier-Foster, J.M.; Look, A.T.; Park, J.R.; et al (2015).** Augmented expression of MYC and/or MYCN protein defines highly aggressive MYC-driven neuroblastoma: A children’s oncology group study. *Br. J. Cancer*, 113, 57–63.
- **Westermarck, Ulrica K., Margareta Wilhelm, Anna Frenzel, and Marie Arsenian Henriksson.** ‘The MYCN Oncogene and Differentiation in Neuroblastoma’. *Seminars in Cancer Biology, Neuroblastoma Research Progress - A 2011 Perspective*, 21, no. 4 (1 October 2011): 256–66. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.08.001>.
- **Yang Q, Olshan AF, Bondy ML, Shah NR, Pollock BH, Seeger RC, Look AT, Cohn SL (2000).** Parental smoking and alcohol consumption and risk of neuroblastoma. *Cancer Epidemiol Biomark Prevent* 9:967–972
- **Zeine, R.; Salwen, H.R.; Peddinti, R.; Tian, Y.; Guerrero, L.; Yang, Q.; Chlenski, A.; Cohn, S.L (2009).** Presence of cancer-associated fibroblasts inversely correlates with Schwannian stroma in neuroblastoma tumors. *Mod. Pathol.* 22:950–958.
- **Zhong, X.; Zhang, Y.; Wang, L.; Zhang, H.; Liu, H.; Liu, Y (2019).** Cellular components in tumor microenvironment of neuroblastoma and the prognostic value. *Peer J.* 7, e8017.
- **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.

Références bibliographique

- **ZYTO VISION MOLECULAR DIAGNOSTICS SIMPLIFIED.** « *Zyto Dot de SPEC MYCN Probe* », (en ligne), November 2020, (<https://www.zytovision.com/products/zytodot2c/c-3029>)
- **ZYTO VISION MOLECULAR DIAGNOSTICS SIMPLIFIED.** « *Zyto Dot 2C Products for CISH analysis* » (en ligne), November 2020, (<https://www.zytovision.com/products/zytodot2c>)

ANNEXE 1

Classification des différents stades du neuroblastome selon des critères cliniques

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 N-MYC.
STADE IV	60 % sont N-MYC 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.

Tableau 1 : Classification d'Evans

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 ré sécable 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 (International Neuroblastoma Staging System).

ANNEXE 2

Préparation des solutions

Préparation de 100ml de SDS 10% :

- Pour 10% : 10g → 100 ml eau distillée

Préparation de 200ml de TBS 20% :

- Pour 20% : 50ml de TBS → 100 ml eau distillé

Préparation de 1000ml de formol 10% :

- Pour 10% : 10ml de formol → 100 ml eau distillé

Préparation de 30ml de TBS 3% :

- Pour 3% : 3ml de TBS → 100 ml eau distillé

Préparation de peroxydase d'hydrogène :

- 1V H₂O₂ → 9V de méthanol

Préparation de Hématoxyline de Harris :

- Hématoxyline : 9 g
- Ethanol absolu : 90 ml
- Alun potassique : 180 g
- Eau distillée : 1800 ml
- Oxyde mercurique : 4,5 g
- Thymol : 9 g

Préparation de Hématoxyline de Mayer :

- Eau distillée : 1.000 ml
- Hématoxyline cristallisée : 1 g
- Iodate de sodium 0,2 g
- Alun de potassium pulvérisé : 50 g

ANNEXE 3



Nuclear blue solution



Wash buffer SSC



Anti-DIG/DNP-Mix



Peroxide Block



Solution EDTA



la colle fixogume



HRP/AP-POLYMER-Mix



AP-RED solution B et A

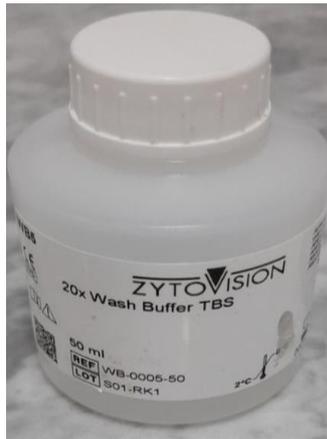


Bloc

ANNEXE



HRP-GREEN Solution B et A



A20x wash buffer TBS



Pepsine solution



Porteur des lames



Micropipette



Porte-lame en verre



Pence

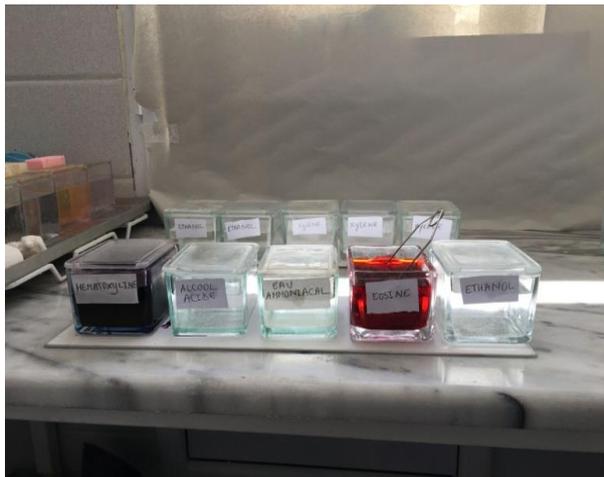
ANNEXE 4



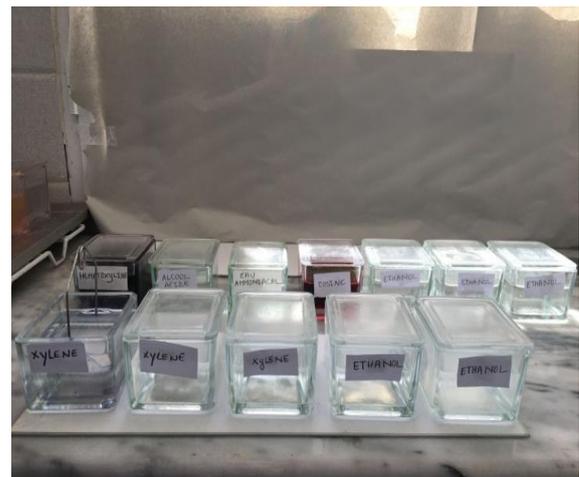
Automate à circulation (Leica)



Etuve



Les bains de coloration



Les bains de xylène et d'éthanol



L'hybridaizer



Plaque chauffante

ANNEXE



Dako CoverStainer automatise chaque étape du processus H&E, depuis la cuisson, le déparaffinage et la coloration jusqu'à la lame déshydratée, recouverte d'une lamelle et séchée qui est prête à être examinée par le pathologiste.



Salle d'examen macroscopique



Pièce opératoire d'une tumeur surrénalienne

ANNEXE 5

Sexe	N cas	%
Garçons	8	40
Filles	12	60
Total	20	

Tableau 3: Répartition des NB selon le sexe.

Age	N cas	%
0-1	6	30
1-2	1	5
2-3	1	5
3-4	4	20
4-5	2	10
>5	6	30
Total	20	

Tableau : Répartition de NB selon l'âge

Siège	N cas	%
Cervical	0	0
Thoracique	4	20
Abdominal	13	65
Pelvien	3	15
Total	20	

Tableau 4 : Répartition de NB selon le siège

Niveau	N cas	%
Haut niveau	9	45
Faible niveau	5	25
Aucun niveau	6	30
Total	20	

Tableau 5: répartition de NB selon niveau d'amplification de NMYC