

2m11.2820.9

Université de Montréal

**Caractérisation cytogénétique de la lignée de médulloblastome
UM-MB1 par hybridation génomique comparative modifiée
(mCGH) et hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)**

par

France Léveillé

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

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

Novembre 1999

© France Léveillé, 1999



W
4
N58
2000
N. 126

Identification du jury

**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

Ce mémoire intitulé:

**Caractérisation cytogénétique de la lignée de médulloblastome
UM-MB1 par hybridation génomique comparative modifiée
(mCGH) et hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)**

présenté par

France Léveillé

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président-rapporteur : Dr. Féridoun Babai

Directeur de recherche : Dre Nicole Lemieux

Membre du jury : Dr. Richard Bertrand

Mémoire accepté le:2000-05-01.....

SOMMAIRE

Le médulloblastome (MB), tumeur neuroectodermique primitive (PNET) du cervelet, représente la tumeur maligne du système nerveux central la plus fréquente dans la population pédiatrique. Bien que les événements pathogénétiques impliqués dans le développement et la progression de cette tumeur demeurent encore indéterminés, l'anomalie chromosomique la plus fréquente, retrouvée dans environ 30 à 50% des cas, est l'isochromosome des bras longs du 17 [i(17q)]. Par conséquent, cette aberration chromosomique semble jouer un rôle potentiel dans l'oncogenèse des tumeurs PNETs/MBs.

Les lignées cellulaires tumorales constituent un système d'études valable pour une meilleure compréhension de la biologie des cancers. De plus, elles procurent une source importante de matériel génétique pour le clonage des gènes spécifiques qui y sont affectés. Toutefois, dans le but ultime d'isoler et de caractériser ces gènes potentiellement impliqués dans l'oncogenèse des cancers, l'identification des déséquilibres chromosomiques spécifiques et non aléatoires s'impose.

En ce qui concerne les lignées cellulaires PNETs/MBs présentées dans la littérature, aucune analyse chromosomique moléculaire détaillée n'a été effectuée. Par conséquent, la caractérisation de plusieurs remaniements chromosomiques et de chromosomes marqueurs demeure imprécise.

Le but de notre projet de recherche est d'évaluer le profil chromosomique de la nouvelle lignée cellulaire de médulloblastome UM-MB1, établie par l'équipe du Dr. Yves Théorêt de l'Hôpital Sainte-Justine (Kenigsberg *et al.*, 1997). Afin d'atteindre ce but, nous avons identifié les régions chromosomiques sur-représentées et perdues dans cette lignée par l'analyse conjointe de la cytogénétique classique et moléculaire: l'élaboration de caryotypes, l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) de peintures chromosomiques et l'hybridation génomique comparative modifiée (mCGH). L'étude du caryotype de la lignée UM-MB1, à partir de cinq passages différents, révèle un clone principal de cellules para-tétraploïdes (± 92 ou $\pm 4n$) à 75 chromosomes, comportant plusieurs aberrations chromosomiques récurrentes. Les régions sur-représentées et détectées par mCGH, touchent les bras chromosomiques 15q (80% des métaphases analysées) et 22q (60%), les régions 7q11.2→qter (60%), 12q22→qter (28%), 17q21→qter (28%) et les locus chromosomiques 2q34→q36 (26%) et 2p22→p24 (22%). Les principales régions chromosomiques perdues ou délétées, identifiées par l'analyse du caryotype et la FISH, concernent les bras courts du chromosomes 9 (perte de 4 copies), ainsi que les régions 10q24~26→qter (1 copie), 11pter→p13 (2 copies), 11q13→qter (2 copies), 16q11.2→qter (2 copies) et 17q21→qter (2 copies). Par ces travaux, nous pouvons conclure que la lignée cellulaire UM-MB1 possède plusieurs anomalies chromosomiques clonales, concordant avec celles retrouvées dans la littérature des tumeurs PNETs/MBs. De plus, nous avons identifié deux nouvelles régions

de gain au niveau des bras longs des chromosomes 15 et 22, régions potentiellement importantes dans la pathogenèse de ces tumeurs.

Cette étude confirme également l'efficacité de la technique du mCGH pour la détection précise des régions sur-représentées dans les cancers. De plus, puisque cette nouvelle lignée cellulaire (UM-MB1) est représentative des tumeurs PNETs/MBs, elle constitue un outil de choix pour le clonage éventuel des gènes candidats, ainsi que pour l'étude de la biologie du MB.

TABLE DES MATIÈRES

Identification du jury	i
SOMMAIRE	ii
TABLE DES MATIÈRES	v
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xi
Liste des sigles et des abréviations	xii
Remerciements	xvi

CHAPITRE 1: INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 LA NATURE GÉNÉTIQUE DU CANCER	1
1.2 LA CYTOGÉNÉTIQUE ET LE CANCER	1
1.2.1 L'apport de la cytogénétique à l'étude des cancers	1
1.2.1.1 Historique	2
1.2.1.2 Exemples classiques	3
1.2.1.3 Nomenclature des populations cellulaires tumorales	4
1.2.1.4 Mécanismes cytogénétiques de l'oncogenèse	6
1.3 LES TUMEURS CÉRÉBRALES PÉDIATRIQUES	6
1.4 LES TUMEURS NEUROECTODERMIQUES PRIMITIVES	9
1.4.1 La problématique de la classification	9
1.4.2 PNET du SNC versus PNET périphérique	12
1.5 LES TUMEURS EMBRYONNAIRES	12
1.6 LE MÉDULLOBLASTOME: REVUE DE LA LITTÉRATURE	13
1.6.1 Généralités	13
1.6.2 Signes cliniques	16
1.6.3 Maladies héréditaires associées au MB	17
1.6.3.1 Le syndrome de Turcot	17
1.6.3.2 Le syndrome de Gorlin	18
1.6.4 La génétique moléculaire du MB	19
1.6.5 L'empreinte parentale et le MB	24
1.6.6 Les gènes de régulation et le MB	26

1.6.7 Les gènes apoptotiques et le MB	27
1.6.8 Traitement et pronostic	29
1.6.8.1 Séquelles causées par la thérapeutique.....	30
1.6.9 Marqueurs de pronostic.....	31
1.6.10 Développement des lignées cellulaires PNETs/MBs.....	35
1.7 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES DU PRÉSENT TRAVAIL	36

CHAPITRE 2: MÉTHODOLOGIE

2.1 ÉTABLISSEMENT DE LA LIGNÉE CELLULAIRE UM-MB1.....	40
2.1.1 L'obtention des chromosomes	44
2.2 CYTOGÉNÉTIQUE CONVENTIONNELLE: L'ANALYSE CARYOTYPIQUE.....	45
2.3 CYTOGÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE:.....	45
2.3.1 L'hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH).....	45
2.3.4 L'hybridation génomique comparative:.....	46
Technique originale (CGH) et modifiée (mCGH)	46

CHAPITRE 3: ARTICLE

Caractérisation de la lignée humaine de médulloblastome UM-MB1 par l'analyse combinée de l'hybridation génomique comparative modifiée et de l'hybridation *in situ* en fluorescence

"Molecular Cytogenetic Characterization of the Human Medulloblastoma Cell Line UM-MB1 by Combined Modified Comparative Genomic Hybridization and Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization Analysis"	51
"ABSTRACT"	52
"INTRODUCTION"	53
"MATERIAL AND METHODS"	55
"Cell Line and Cultures"	55
"Cytogenetic Analysis"	56
"Molecular Cytogenetic Analysis"	56

"RESULTS"	58
"DISCUSSION"	60
"Tabular Material"	76
"Acknowledgments"	77
"REFERENCES"	78
CHAPITRE 4: DISCUSSION GÉNÉRALE	86
4.1 L'HYBRIDATION GÉNOMIQUE COMPARATIVE (CGH)	86
ET MODIFIÉE (MCGH)	86
4.1.1 Avantages	86
4.1.2 Validation	87
4.1.3 Sensibilité de détection	87
4.1.4 Limites	88
4.2 IMPORTANCE DE LA CARACTÉRISATION DÉTAILLÉE DES LIGNÉES PNETs/MBs	89
4.3 LA LIGNÉE UM-MB1: UNE ANALYSE CYTOGÉNÉTIQUE COMBINÉE PAR CT, FISH ET MCGH	90
4.4 PROFIL CYTOGÉNÉTIQUE DE LA LIGNÉE UM-MB1: UNE COMPARAISON AVEC LA LITTÉRATURE	93
4.4.1 L'amplification génique dans le MB	93
4.4.2 Les anomalies chromosomiques dans le MB	95
4.4.2.1 Chromosome 1.....	95
4.4.2.2 Chromosome 2.....	96
4.4.2.3 Chromosome 3.....	98
4.4.2.4 Chromosome 5.....	99
4.4.2.5 Chromosome 6.....	100
4.4.2.6 Chromosome 7.....	101
4.4.2.7 Chromosome 8.....	102
4.4.2.8 Chromosome 9.....	103
4.4.2.9 Chromosome 10.....	104
4.4.2.10 Chromosome 11.....	106
4.4.2.11 Chromosome 12.....	107
4.4.2.12 Chromosome 13.....	108
4.4.2.13 Chromosome 15.....	110
4.4.2.14 Chromosome 16.....	110
4.4.2.15 Chromosome 17.....	111

4.4.2.17 Chromosome 22.....	113
4.4.2.18 Chromosomes sexuels	115
5. CONCLUSION GÉNÉRALE	118
6. BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE.....	122
7. ANNEXE.....	137

LISTE DES FIGURES

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Figure 1. Le médulloblastome: aspect macroscopique.....15

2. MÉTHODOLOGIE

Figure 1. Le médulloblastome: analyse phénotypique.....40

Figure 2. Lignée cellulaire UM-MB1 en culture (passage 53).....43

Figure 3. Représentation schématique de la technique d'hybridation
génomique comparative (CGH).....49

Figure 4. Représentation schématique de la technique d'hybridation
génomique comparative modifiée (mCGH).....49

3. ARTICLE

Figure 1. Caryotype représentatif de la lignée UM-MB1 en bandes GTG.
Les chiffres situés de part et d'autre des chromosomes indiquent la nature
des remaniements chromosomiques, confirmée par FISH.....69

Figure 2. Série de peintures chromosomiques sur métaphases tumorales
de la lignée UM-MB1 par FISH. **A)** Chromosome 2; **B)** Chromosome 12;
C) Chromosome 15; **D)** Chromosome 16; **E)** Chromosome 17;
F) Chromosome 22.....71

Figure 3. **A)** mCGH de la lignée UM-MB1 sur chromosomes métaphasiques
normaux. **B)** Chromosomes métaphasiques normaux en bandes R induites
par une solution de PPD à pH 11.....73

Figure 4. Idiogramme en bandes R montrant la localisation chromosomique des séquences sur-représentées dans la lignée UM-MB1 par mCGH.

Chacune des lignes verticales fines représente 1 signal alors que les lignes noires plus larges symbolise 5 signaux.....75

7. ANNEXE

Figure 1. Idiogramme en bandes G du bras court du chromosome 17 humain et localisation de ses locus chromosomiques.....137

LISTE DES TABLEAUX

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Tableau I. Locus génétiques impliqués dans les tumeurs cérébrales pédiatriques.....	7
---	---

3. ARTICLE

Tableau I. Comparaison des résultats de la lignée UM-MB1 obtenus par cytogénétique, FISH et mCGH.....	76
---	----

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

<i>ABR</i>	: " <i>active BCR-related gene</i> "
ADN	: acide désoxyribonucléique
<i>APC</i>	: " <i>adenomatous polyposis colic gene</i> "
ARN	: acide ribonucléique
ARNm	: acide ribonucléique messenger
ATT/Rh	: "atypical teratoid/rhabdoid tumors"
BCCs	: "basal cell carcinomas"/carcinomes basocellulaires
<i>BCL</i>	: " <i>B-cell lymphoma/leukemia gene</i> "
<i>BCR</i>	: " <i>break-point cluster region gene</i> "
BDNF	: "brain-derived neurotrophic factor"
bHLH	: "basic helix-loop-helix"
CCNU	: "combination vincristine sulfate and lomustine"
Cdk4	: kinase dépendante de la cycline 4
CMT1A	: maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A
CT	: cytogénétique conventionnelle
DM	: double minutes
<i>EGFR</i>	: " <i>epithelial growth factor receptor gene</i> "
<i>EWS</i>	: <i>gène de susceptibilité au sarcome d'Ewing</i>
ex	: exemple
<i>F13B</i>	: " <i>B subunit of the coagulation factor XIII gene</i> "
FAB	: "French-American-British"
FAP	: "familial adenomatous polyposis"

<i>FHIT</i>	: " <i>fragile histidine triad gene</i> "
<i>FKHR</i>	: " <i>human homolog of the Drosophila region-specific homeotic gene fork head</i> "
FISH	: "fluorescence <i>in situ</i> hybridization"
FITC	: fluorescéine isothiocyanate
<i>FLI-1</i>	: " <i>friend leukemia integration site 1 gene</i> "
<i>HIC-1</i>	: " <i>hypermethylated in cancer gene</i> "
HPS	: hématoxyline phloxine safran
HSR	: "homogeneously stained region"
i	: isochromosome
IA	: index apoptotique
<i>IFN</i>	: " <i>interferon gene</i> "
<i>IGF2</i>	: " <i>insulin-like growth factor II gene</i> "
<i>IGL</i>	: " <i>light-chain locus</i> "
ISH	: "in situ hybridization"
KCL	: chlorure de potassium
LCR	: liquide céphalorachidien
<i>LIS-1</i>	: " <i>lissencephaly gene 1</i> "
LLA	: leucémie lymphoblastique aiguë
LLC	: leucémie lymphoblastique chronique
LMA	: leucémie myéloïde aiguë
LMC	: leucémie myéloïde chronique
LPA	: leucémie promyélocytaire aiguë
LOH	: "loss of heterozygosity"

LOI	: "loss of imprinting"
M	: masse molaire
Mb	: mégabase
MB	: médulloblastome
mCGH	: "modified comparative genomic hybridization"
<i>MDM2</i>	: " <i>murine double-minutes-2 gene</i> "
<i>MMAC1</i>	: " <i>mutated in multiple advanced cancers 1</i> "
MMR	: "mismatch repair"
NB	: neuroblastome
NBCCS	: "nevoid basal cell carcinoma syndrome"
NGF	: "nerve growth factor"
NT-3	: neurotrophine-3
<i>OVCA</i>	: " <i>ovarian cancer gene</i> "
p	: bras court d'un chromosome
<i>PAX</i>	: " <i>paired box containing genes</i> "
PCNA	: "proliferating cell nuclear antigen"
<i>PEDF</i>	: " <i>pigment epithelium-derived factor gene</i> "
PHA	: phytohémagglutinine
PI	: iodure de propidium
PMI	: pourcentage de l'index mitotique
<i>PML</i>	: " <i>promyelocytic leukemia gene</i> "
PNET	: "primitive neuroectodermal tumor"
PPD	: p-phénylènediamine

<i>PTCH</i>	: " <i>human homolog of the Drosophila patched gene</i> "
<i>PTEN</i>	: " <i>phosphatase and tensin homolog gene</i> "
q	: bras long d'un chromosome
QI	: quotient intellectuel
<i>RAR-α</i>	" <i>retinoic acid receptor-α gene</i> "
<i>RBI</i>	: <i>gène de susceptibilité au rétinoblastome</i>
<i>RPH3AL</i>	: " <i>rabphilin-3A-like gene</i> "
<i>SMO</i>	: " <i>smoothened gene</i> "
SSM	: syndrome de Smith-Magenis
SNC	: système nerveux central
t	: translocation
ter	: région terminale d'un chromosome
<i>TNF-α</i>	: " <i>tumor necrosis factor-α</i> "
WHO	: " <i>world health organization</i> "
<i>WT1</i>	: " <i>gène de susceptibilité à la tumeur de Wilms</i> "

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dre Nicole Lemieux de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir ainsi permis de découvrir et d'apprécier l'univers des chromosomes, pas seulement appliqué à l'étude des cancers, mais également à la cytogénétique constitutionnelle. Merci aussi pour toute l'aide que vous m'avez apportée tout au long de ma maîtrise, ainsi que pour votre enthousiasme et nos discussions scientifiques et autres... Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance envers le Dr. Yves Théorêt pour son support, sa générosité, ainsi que pour le temps et les moyens matériels qu'il m'a accordés. Merci également aux Drs Yves Robitaille et Jean Michaud pour le matériel histologique offert et les explications concernant l'aspect histologique du médulloblastome.

Je voudrais également remercier mes collègues passés et actuels du laboratoire de cytogénétique moléculaire: Mesdames Linda Abed, Sophie Dubé et Mariléna Cojocar, ainsi que Messieurs Michel Assad, Martin DesGroseilliers et François Depault, pour l'ambiance amicale et d'entraide qui y règne. Un merci tout spécial à Madame Fléchère Fortin, la laborantine qui m'a beaucoup appris et aidée tout au long de ce projet. Merci également aux Messieurs Stéphane Dedelis, Gaston Lambert et Jean Léveillé pour le travail photographique accompli.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans un gros merci à ma famille et amis (es), de m'avoir constamment encouragée et soutenue tout au long de mes études et projets.

En terminant, j'aimerais remercier le Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine et le Téléthon des Étoiles sur les maladies infantiles pour leur soutien financier.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 LA NATURE GÉNÉTIQUE DU CANCER

Malgré la diversité des cancers et la multiplicité de leur étiologie, un fait est certain, ils résultent d'un dérèglement du programme génétique de la cellule. 5% de tous les cancers semblent familiaux. Dans la grande majorité des cas, la transmission semble jouer un rôle de faible importance; voire même, pas de rôle du tout (Thompson *et al.*, 1995). Néanmoins, un grand nombre de cancers ont une origine multifactorielle, dont une composante génétique importante puisque certains individus sont prédisposés au développement d'une tumeur maligne en raison de défauts génétiques prédisposant au cancer. De plus, selon les évidences acquises jusqu'à ce jour, pratiquement tous les cancers, même en l'absence de composantes héréditaires apparentes, résultent de mutations dans les cellules somatiques et leur progression implique également l'expression d'une série de gènes.

1.2 LA CYTOGÉNÉTIQUE ET LE CANCER

1.2.1 L'apport de la cytogénétique à l'étude des cancers

La cytogénétique représente la branche de la génétique (science de l'hérédité) qui s'intéresse à l'étude des chromosomes. L'évaluation cytogénétique des néoplasmes fournit des informations précieuses, constituant un outil clef pour

le diagnostic, le pronostic et le traitement. En effet, la détection de certaines anomalies cytogénétiques spécifiques associées à des néoplasmes représentent des marqueurs importants de diagnostic, influençant ainsi l'orientation de la thérapie. De plus, la mise en évidence d'un nombre accru d'aberrations chromosomiques spécifiques constitue un matériel unique pour l'identification des gènes qui contrôlent la prolifération ou la différenciation des cellules tumorales. Ainsi, la caractérisation de l'altération structurale et fonctionnelle de ces gènes permet d'accroître la compréhension des mécanismes de la carcinogenèse.

1.2.1.1 Historique

C'est en 1890, par le pathologiste allemand David von Hansemann, que l'origine et le développement des cancers furent associés aux irrégularités mitotiques et nucléaires des cellules tumorales (Heim et Mitelman, 1995). Un quart de siècle plus tard, en 1914, Théodor Boveri postule que le cancer est un problème cellulaire monoclonal, dans lequel le dérèglement des divisions cellulaires est provoqué par une anomalie chromosomique (Kaplan et Delpech, 1989). Cependant, durant la première moitié du XX^{ième} siècle, l'idée centrale du raisonnement de Boveri n'a pu être testée à cause des difficultés techniques, empêchant la visualisation précise des chromosomes de mammifères. Grâce aux nombreux travaux et à l'amélioration importante des techniques de culture et d'obtention des chromosomes, l'étude du comportement des populations

cellulaires malignes a permis une plus grande compréhension du rôle des changements caryotypiques dans les néoplasmes. En effet, même si certaines anomalies chromosomiques sont responsables de la phase d'initiation du cancer, une grande portion d'entre-elles (numériques et/ou structurales) prennent plutôt naissance durant la phase de progression, affectant ainsi le développement et l'évolution des tumeurs ou des hémopathies. La difficulté réside souvent entre la distinction des changements chromosomiques primaires (phase d'initiation) ou secondaires (phase de progression), aussi bien qu'entre l'identification de certaines anomalies comme étant une étape dans le processus de la carcinogénèse ou comme facteurs rendant les cellules transformées encore plus malignes (Therman et Susman, 1993).

1.2.1.2 Exemples classiques

Initialement, puisque les cellules sanguines se prêtaient beaucoup mieux à l'exploration cytogénétique que les cellules des tumeurs solides, les anomalies chromosomiques étaient essentiellement documentées dans le domaine des hémopathies malignes. Par conséquent, les premières corrélations cliniques émergeant de la cytogénétique tumorale, concernent surtout les hémopathies malignes. Les deux exemples les plus caractéristiques sont: la translocation entre les chromosomes 9 et 22 observée dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) (pour plus de détails voir section 4.4.2.17, Chapitre 4) et la translocation entre les chromosomes 8 et 14 dans le lymphome de Burkitt (observée chez 75 à 85% des

patients) (Thompson *et al.*, 1995). Pour les tumeurs solides, où l'analyse cytogénétique fine dépend de l'obtention de préparations chromosomiques adéquates, les progrès ont été moins rapides. Le développement de techniques appropriées de cultures a contribué à une meilleure description du phénotype cytologique des cellules tumorales, ainsi qu'à l'évaluation plus précise de plusieurs tumeurs malignes. Aujourd'hui, plus de 100 translocations chromosomiques sont associées à des processus oncogéniques, déclenchés le plus fréquemment par la formation d'une protéine de fusion spécifique à une tumeur (Kingston, 1994; Rabbitts, 1994). De plus, l'étude des délétions chromosomiques observées dans l'ADN constitutionnel de certains enfants atteints de cancer de forme familiale (sujet que nous discuterons dans la section sur les tumeurs embryonnaires de ce présent chapitre), a permis de découvrir le phénomène de l'oncogenèse par perte de gène suppresseur de tumeur.

1.2.1.3 Nomenclature des populations cellulaires tumorales

Dans cette section, il vous sera présenté quelques termes fréquemment employés dans le domaine de la cytogénétique du cancer et reliés aux anomalies retrouvées dans les néoplasies.

Le concept de clone tumoral est défini comme étant une population cellulaire qui dérive d'une seule cellule progénitrice dans laquelle un événement initial a eu lieu. La lignée principale ("mainline") représente la constitution

chromosomique la plus fréquente d'une population cellulaire tumorale. C'est un terme quantitatif décrivant le clone tumoral le plus important. Alors que la lignée souche d'une population cellulaire tumorale et les sous-clones qui en découlent sont qualifiés de "stemline" et de "sideline". Il existe deux types d'anomalies chromosomiques clonales: 1) anomalie structurale qui doit être retrouvée dans deux cellules ou plus; 2) numérique (perte ou gain chromosomique) où le même changement doit être présent dans au moins trois métaphases (Heim et Mitelman, 1995). Comme déjà mentionné, plusieurs études ont révélé que certaines de ces anomalies étaient caractéristiques pour un cancer donné (exemple classique des leucémies) et ont montré l'utilité de les repérer afin de préciser le diagnostic, d'évaluer le pronostic et d'orienter le traitement. Alors que la lignée principale d'une population cellulaire tumorale symbolise la constitution chromosomique la plus fréquente ou le clone le plus commun (ISCN, 1995), le nombre modal de chromosomes désigne le nombre de chromosomes le plus fréquemment retrouvé dans une population cellulaire tumorale. Il peut varier de para-haploïde ($23\pm$) à polyploïde ($>2N$). Une cellule est dite euploïde lorsque le nombre de chromosomes qu'elle contient est égal à un multiple du nombre haploïde ($23N$), alors qu'elle est dite aneuploïde si le nombre chromosomique varie du nombre normal (ex: 45 chromosomes).

1.2.1.4 Mécanismes cytogénétiques de l'oncogenèse

Les aberrations chromosomiques retrouvées dans les néoplasies résultent d'un spectre très large de phénomènes: gain ou perte de chromosomes individuels (par exemple: trisomie ou monosomie), translocation, insertion, inversion, délétion, duplication, formation d'isochromosome, d'isodicentrique ou de chromosome en anneau. L'amplification génique peut s'exprimer par des régions qui se colorent de façon homogène (HSR) ou par de très petits fragments chromosomiques, les doubles minutes (DM). Les gènes peuvent être également relocalisés par des remaniements équilibrés telles les translocations réciproques équilibrées, les insertions et les inversions. En outre, plusieurs tumeurs sont caractérisées par la présence de chromosomes marqueurs, résultant souvent de cassures multiples et dont la nature est indéterminée (Therman et Susman, 1993).

1.3 LES TUMEURS CÉRÉBRALES PÉDIATRIQUES

Les tumeurs du système nerveux central (SNC) représentent le plus grand groupe de tumeurs solides chez les enfants et constituent, après les hémopathies, la cause la plus importante de malignité chez les moins de 15 ans (Heideman *et al.*, 1997). De plus, les tumeurs cérébrales primaires comptent pour le quart des mortalités causées par le cancer chez ces enfants. Bien que plusieurs facteurs environnementaux potentiels ont été évoqués, tels que les neuro-carcinogènes chimiques, les virus, les maladies infectueuses, la radiation ionisante et les

champs électromagnétiques à faible fréquence, aucun agent causal définitif n'a été identifié (Merzak et Pilkington, 1997). Toutefois, les tumeurs cérébrales pédiatriques, même si la majorité des cas sont sporadiques, peuvent se présenter en association avec certains désordres génétiques héréditaires, tels la neurofibromatose de type 1 et 2, les syndromes de Li-Fraumeni et de Turcot, ainsi que la sclérose tubéreuse (Tableau I). À l'heure actuelle, bien que les événements génétiques contribuant à l'initiation ou à la progression des tumeurs cérébrales demeurent relativement peu connus, la neuro-oncologie effectue des progrès considérables au niveau de l'augmentation du taux de survie des enfants atteints.

Tableau I

Locus génétiques impliqués dans les tumeurs cérébrales pédiatriques *

Tumeurs	Chromosomes	Désordres	Gènes
PNET/MB	5q21-q22 9q22.3 17p13 17q	Syndrome de Turcot NBCCS	<i>APC</i> <i>PTCH</i> <i>?suppresseur</i> <i>?ERBB2</i>
Astrocytome grade III à IV	7p12 17p13.1 17q11.2	Syndrome Li-Fraumeni Neurofibromatose-1	<i>EGFR</i> <i>TP53</i> <i>NF1</i>
Tumeur subépendymaire à cellules géantes	9q34, 16p13	Sclérose Tubéreuse	<i>TSC1, TSC 2</i>
Méningiome	22q 22q12	Neurofibromatose-2	<i>?suppresseur</i> <i>NF2</i>
Tumeur rhabdoïde/ tératoïde atypique	22q11.2		<i>?suppresseur</i>

PNET/MB, tumeur neuroectodermique primitive/médulloblastome; NBCCS, syndrome des carcinomes basocellulaires névoïdes. *Tiré de Biegel, 1997.

Les tumeurs cérébrales pédiatriques diffèrent grandement de celles retrouvées chez l'adulte. Premièrement, la majorité des tumeurs retrouvées chez l'enfant sont peu fréquentes chez l'adulte, et vice versa. Par exemple, les astrocytomes sont dépistés de façon prédominante chez l'adulte (Heideman *et al.*, 1997). Deuxièmement, les tumeurs de la fosse postérieure représentent un pourcentage élevé des tumeurs cérébrales chez l'enfant comparativement à celles chez l'adulte. En effet, environ 50% des tumeurs cérébrales chez les enfants de plus de 1 an se développent en position sous-tentorielle, au niveau du cervelet et du tronc cérébral, affectant ainsi les centres vitaux contrôlant le rythme cardiaque et la respiration. Alors que chez l'adulte, la majorité des néoplasmes sont supratentoriels (Merzak et Pilkington, 1997). Troisièmement, la résection chirurgicale complète et extensive, controversée pour les tumeurs cérébrales malignes de l'adulte, donne d'excellents résultats pour une variété de tumeurs cérébrales infantiles. Quatrièmement, l'utilisation de la chimiothérapie améliore de façon considérable le pronostic clinique des tumeurs cérébrales chez l'enfant, alors qu'elle ne démontre pas encore de bénéfice majeur pour les tumeurs de l'adulte. En outre, puisque l'usage de la radiation altère les capacités intellectuelles ainsi que le développement physique des enfants, la chimiothérapie est de plus en plus employée (afin de retarder ou d'abolir la radiothérapie) particulièrement chez les enfants de 3 ans et moins dont les tumeurs sont de faibles grades et non totalement résecquées ou de grades élevés. Finalement, il s'avère que le pronostic de tumeurs histologiquement similaires est souvent plus favorable chez l'enfant que chez l'adulte (Pollack, 1999).

1.4 LES TUMEURS NEUROECTODERMIQUES PRIMITIVES

Bien que la controverse de la classification des tumeurs neuroectodermiques primitives (PNETs) existe depuis plus de 70 ans, leur discussion n'en demeure pas moins contemporaine et les issues litigieuses. Malgré les nombreux aspects considérés, et maintes fois discutés, la confusion générale demeure. Jusqu'à quel point les caractères biologiques manifestés par ce groupe de tumeurs sont-ils similaires? Plus spécifiquement, jusqu'à quel point l'origine cellulaire de ces tumeurs, ainsi que leur potentiel de différenciation et leur réponse aux traitements sont-ils similaires? (Moore *et al.*, 1996).

1.4.1 La problématique de la classification

Puisque l'essence même du problème, suscité par des divergences d'opinions, concerne l'origine et la biologie des tumeurs pédiatriques du SNC, plusieurs classifications ont été proposées.

Selon Rubinstein (1985), ces tumeurs embryonnaires prennent naissance à partir d'une seule cellule d'origine, à différents sites du système nerveux et sont par conséquent, identifiables selon leur patron de différenciation respectif. Bien que la plupart des scientifiques soutiennent l'idée que ces cellules tumorales, vraisemblablement primitives, montrent une forte tendance à diverger vers les lignées gliales ou neuronales, Rubinstein suggère que ce phénomène de

différenciation se présente dans les cellules déjà engagées dans l'une de ces directions, comme étant le résultat des effets de l'environnement local où elles prennent naissance (Heideman *et al.*, 1997). Ainsi, selon cette approche, ces néoplasmes (peu différenciés) sont regroupés sous le terme de tumeurs embryonnaires et sous-classifiés selon leurs traits morphologiques distincts, révélant leur propre type de maturation cellulaire. Par exemple, si dans une tumeur donnée certaines structures suggèrent une différenciation épendymaire, elle est identifiée comme étant un épendymoblastome (Moore *et al.*, 1996).

L'approche alternative est de traiter toutes ces tumeurs embryonnaires, (peu différenciées) montrant une ressemblance histologique commune, en un seul groupe sous le terme de tumeurs neuroectodermiques primitives ou PNETs (Rorke, 1983). Ici, les protagonistes de ce concept unifié de PNETs suggèrent que ces tumeurs, composées de cellules neuroépithéliales primitives ayant des caractéristiques pathologiques et cliniques similaires, devraient être considérées comme des variants d'un seul type de tumeur, nommé PNET, sans se soucier de leur localisation au niveau du SNC (Heideman *et al.*, 1997). Donc, ces tumeurs sont présumées prendre naissance à partir de cellules primitives nondifférenciées qui conservent la capacité de se différencier de façon divergente.

Cependant, la présence d'un patron histologique commun chez ce groupe de néoplasmes n'implique pas nécessairement un comportement clinique similaire. Ainsi, pour une thérapeutique identique ou similaire, on observe des

différences significatives sur le devenir clinique des patients atteints d'une PNET du cervelet (i.e. médulloblastome) versus une PNET sus-tentorielle (Heideman *et al.*, 1997). Par conséquent, et pour d'autres raisons, certains chercheurs ont proposé de retenir le terme de médulloblastome (MB), puisqu'il représente une entité clinico-pathologique spécifique, différente des tumeurs d'apparence similaire (e.g. PNETs sus-tentorielles) (Heideman *et al.*, 1997). Ainsi, la seule désignation d'un terme ne peut pas impliquer simultanément l'histogenèse, la biologie et le pronostic d'une tumeur.

Tenant compte des problèmes rencontrés dans la classification des tumeurs composées de cellules neuroépithéliales primitives, le comité international de neuropathologistes chargé de réviser la classification WHO (World Health Organization) de 1979, a créé une catégorie générale de "tumeurs embryonnaires", incluant deux sous-catégories de "tumeurs neuroectodermiques primitives": l'une destinée au MB et ses variantes et l'autre renfermant les néoplasmes morphologiquement similaires au MB mais localisés ailleurs dans le SNC (Heideman *et al.*, 1997). Dans le système de classification WHO modifié pour les tumeurs pédiatriques (Rorke *et al.*, 1983) (contrairement aux autres types de classification), des termes cytologiques sont appliqués lorsqu'un type de différenciation cellulaire est détecté. De plus, le site anatomique d'origine est également donné (Moore *et al.*, 1996). Bref, le MB, tumeur cible de notre étude, est catégorisé comme étant une PNET du cervelet, distincte des autres tumeurs neuroépithéliales indifférenciées.

1.4.2 PNET du SNC versus PNET périphérique

Comparativement aux PNETs du SNC, on a identifié dans les PNETs périphériques, tels le sarcome d'Ewing (tumeur maligne de l'os) et les PNETs des tissus mous, un changement chromosomique primaire récurrent, caractérisé par la translocation réciproque $t(11;22)(q24;q12)$, impliquant la fusion de deux gènes, *FLI1* (*friend leukemia integration site 1*), un facteur de transcription nucléaire localisé en 11q24 et *EWS* (*gène de susceptibilité au sarcome d'Ewing*) en 22q12. (Biegel, 1997; Merzak et Pilkington, 1997).

1.5 LES TUMEURS EMBRYONNAIRES

Le rétinoblastome (tumeur de l'oeil) et la tumeur de Wilms (néphroblastome) sont également des tumeurs embryonnaires de l'enfant. Elles sont le plus fréquemment sporadiques, mais dans une proportion significative de cas, ces cancers sont transmis comme un caractère héréditaire dominant. Les cas familiaux peuvent présenter une anomalie constitutionnelle soit, une délétion en 13q14 pour le rétinoblastome et en 11p13 pour la tumeur de Wilms. La mise en évidence de ces anomalies chromosomiques a contribué à l'isolement des gènes *RBI* et *WT1*, respectivement (Cotran *et al.*, 1994). Par conséquent, la prédisposition à ces cancers provient donc, dans un premier temps, d'une perte de matériel génétique, suivie dans un deuxième temps, d'une perte récessive d'un facteur suppresseur de cancer. En opposition, chez les patients développant des

PNETs/MBs, aucune anomalie cytogénétique constitutionnelle n'a été identifiée, bien que l'existence de familles, où plus d'un enfant est affecté, ait déjà été rapportée (Scheurlen *et al.*, 1996).

1.6 LE MÉDULLOBLASTOME: REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.6.1 Généralités

C'est en 1925, par Bailey et Cushing, dans un rapport détaillant les caractéristiques pathologiques et cliniques de 29 patients, que le terme "médulloblastome" fut désigné (Bailey et Cushing, 1925). Le médulloblastome (MB), tumeur embryonnaire invasive et maligne du cervelet (ou PNET du cervelet), représente la tumeur maligne du SNC la plus fréquente dans la population pédiatrique: dont 10 à 20% des néoplasmes primaires du SNC et environ 40% de toutes les tumeurs de la fosse postérieure (Friedman *et al.*, 1991; Burger et Scheithauer, 1994; Heideman *et al.*, 1997).

L'origine cellulaire du MB n'est toujours pas connue. Cependant, selon les travaux de Stevenson et Echlin, effectués en 1934, on suggère qu'elle proviendrait des cellules souches neuronales primitives de la couche granulaire externe du cervelet en développement qui ont la capacité de se différencier soit en lignée neuronale, gliale, astrocytaire, épendymale, musculaire et/ou mélanocytaire (Biegel, 1997; Giangaspero *et al.*, 1997; Rorke *et al.*, 1997). De plus, il a été

démonstré que les MBs expriment des filaments intermédiaires neuronaux, des protéines vésiculaires synaptiques, des récepteurs-facteurs de croissance ainsi que des molécules d'adhésion, suggérant qu'ils originent de neuroblastes qui ont échappé à la différenciation terminale (Trojanowski *et al.*, 1992). Par conséquent, il a été proposé que les cellules néoplasiques des PNETs/MBs récapituleraient partiellement les phases de la maturation des neuroblastes.

Macroscopiquement, le MB a tendance à apparaître sous forme d'une masse lobulée, d'une consistance granulaire et friable (Figure 1, page suivante) (Provias et Becker, 1996). Il est habituellement sans région nécrotique, ni formation kystique ou calcification (Friedman *et al.*, 1991). À l'analyse histologique, plusieurs sous-types sont reconnus. Les MBs, dits classiques, sont caractérisés par une hypercellularité composée de petites cellules à noyaux basophiliques de formes et de tailles variables, avec un cytoplasme difficilement perceptible. Les figures mitotiques sont également fréquentes (Heideman *et al.*, 1997). De plus, on note un regroupement caractéristique de cellules sous la configuration de rosettes d'Homer-Wright, dans plus de 40% des cas (Rorke *et al.*, 1997). Alors que les MBs, dits desmoplastiques, représentent une variante histologique pourvue d'abondante fibres de réticuline et de collagène (Giangaspero *et al.*, 1997). L'aspect histologique de ces deux variantes de MB est présenté à la figure 1, Chapitre 2.

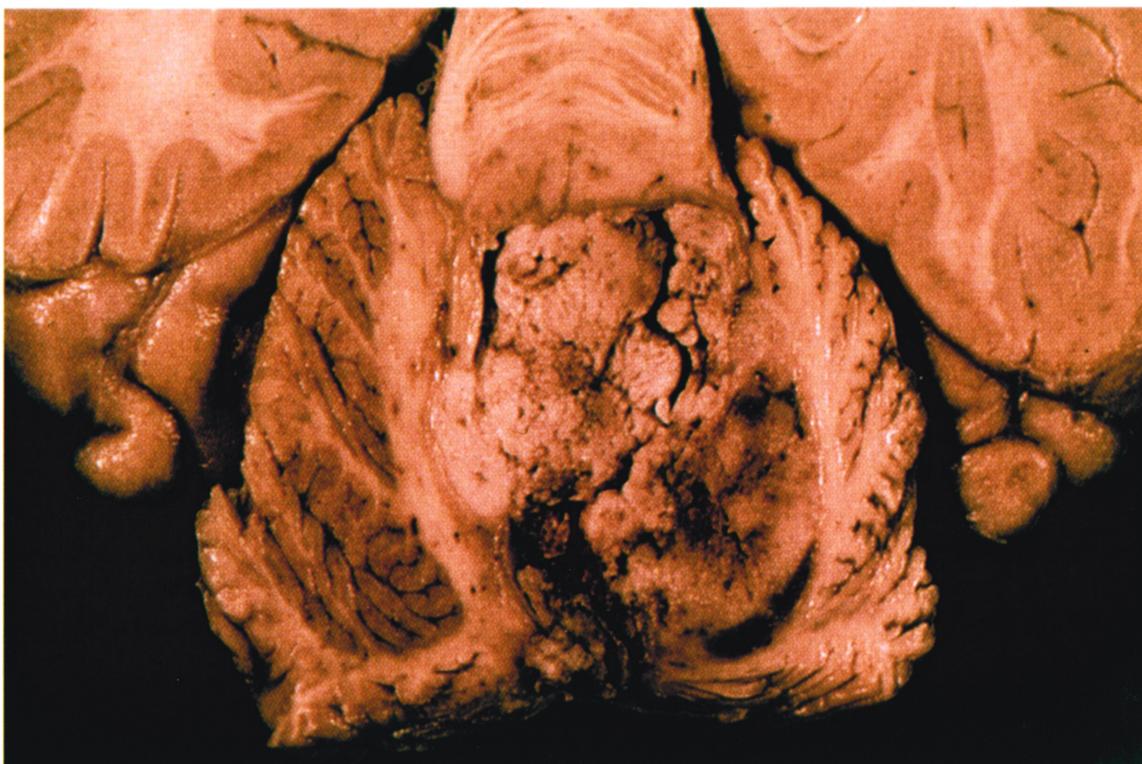


Figure 1. Le médulloblastome: aspect macroscopique
*Gracieuseté du Dr. Jean Michaud, neuropathologiste.

Environ les trois quarts des MBs se forment dans le vermis ou dans le centre du cervelet. Toutefois, les cellules tumorales peuvent croître dans presque n'importe quelle direction, avec une forte tendance à envahir le quatrième ventricule aussi bien que l'espace subarachnoïde. D'ailleurs, l'infiltration du liquide céphalorachidien (LCR) y est fréquente (Provias et Becker, 1996).

L'incidence annuelle du MB est approximativement 5 cas par million d'enfants (Stevens *et al.*, 1991), dont la majorité se développe avant l'âge de 15 ans, habituellement entre 5 et 10 ans. Par contre, il existe de rares cas où il se forme de façon congénitale ou tardivement chez l'adulte (65 ans et plus). De plus, on note une prépondérance mâle d'environ 2:1 (Provias et Becker, 1996).

1.6.2 Signes cliniques

De nombreux symptômes ont été identifiés chez les enfants atteints de tumeurs cérébrales tels de l'irritabilité, de l'inattention, des maux de tête matinaux, des nausées, des vomissements et de la léthargie (Heideman *et al.*, 1997). Selon l'âge et la localisation de la tumeur, ces manifestations cliniques peuvent être le reflet d'une dysfonction cérébelleuse, de l'augmentation de la pression intracrânienne et/ou de la dissémination craniospinale (Burger et Scheithauer, 1994; Pollack, 1999). De plus, la perte d'équilibre ou des fonctions du tronc cérébral (altérations de la coordination des membres supérieurs et de la

démarche) suggère fortement la présence d'une tumeur sous-tentorielle (Heideman *et al.*, 1997).

1.6.3 Maladies héréditaires associées au MB

Le MB peut se développer sporadiquement ou être associé à des syndromes héréditaires, tels le syndrome de Turcot et le syndrome de Gorlin. De plus, son association avec les tumeurs rhabdoïdes malignes du rein et la tumeur de Wilms (néoplasmes embryonnaires rénaux) a également été rapportée (Heideman *et al.*, 1997). Cependant, cette curieuse et énigmatique association n'a pas de cause héréditaire connue.

1.6.3.1 Le syndrome de Turcot

Le syndrome de Turcot est cliniquement caractérisé par la présence de tumeurs cérébrales primaires en association à de multiples adénomes colorectaux, secondaires à des mutations du gène *APC* (*adenomatous polyposis colic gene*, localisé en 5q21) ou bien à des mutations à l'intérieur des gènes de la réparation des "misappariements" (MMR) (Hamilton *et al.*, 1995). Chez les patients atteints de la polypose colique familiale, dont les lignées germinales présentent des mutations du gène *APC*, le MB est la tumeur cérébrale la plus fréquemment retrouvée. Par conséquent, ceci suggère que les mutations du gène *APC* peuvent influencer la formation de certains MBs (à caractère héréditaire), puisqu'aucune

perte d'hétérozygotie pour le locus *APC* ou de mutation somatique au niveau du gène *APC* n'a été identifiée dans les MBs sporadiques (Vortmeyer *et al.*, 1999). En ce qui concerne les patients atteints du syndrome de Turcot dotés d'un système MMR déficient, ils possèdent plutôt une incidence élevée de gliomes. De plus, les résultats de Lee *et al.* (1998) indiquent que le système MMR n'est pas fréquemment altéré dans le MB.

1.6.2.2 Le syndrome de Gorlin

Les individus atteints du syndrome de Gorlin, également nommé syndrome de carcinomes basocellulaires névoïdes (NBCCS), ont une susceptibilité accrue au développement de cancers et plus particulièrement, à la formation de carcinomes basocellulaires (BCCs) (cancer le plus commun dans la population caucasienne) et de MBs (Ingham, 1998; Lam *et al.*, 1999). En effet, on note qu'environ 3-5% des patients NBCCS, développent des MBs (Goodrich *et al.*, 1997; Vorechovsky *et al.*, 1997). Il a été rapporté que le gène *PTCH* (*patched gene*), localisé en 9q22-23, est inactivé dans 30-40% des BCCs sporadiques ainsi que dans 20% des MBs sporadiques, via la perte d'hétérozygotie et la présence de mutations non-sens (Raffel *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 1999). Le groupe de Pietsch (1997) suggère que le gène *PTCH* serait plutôt impliqué dans la formation de la variante desmoplasique (ou nodulaire) du MB. De plus, selon des études récentes, il semblerait que le gène *PTCH2* (gène suppresseur de tumeur homologue à *PTCH*), localisé en 1p32.1-32.3, et *SMO* (*smoothened gene*), identifié comme

proto-oncogène (Xie *et al.*, 1998) et cartographié en 7q31-32, seraient impliqués dans la carcinogenèse de certains BCCs et MBs (Lam *et al.*, 1999; Smyth *et al.*, 1999). Par conséquent, ces études supportent l'hypothèse que les gènes impliqués lors du développement sont susceptibles de jouer un rôle dans la pathogenèse des tumeurs embryonnaires (Biegel, 1997). Évidemment, d'autres études sont nécessaires afin de déterminer le rôle exact de ces gènes dans le développement des PNETs/MBs.

1.6.4 La génétique moléculaire du MB

Contrairement à plusieurs autres tumeurs embryonnaires, comme on l'a vu précédemment, on connaît peu de choses à propos des événements génétiques contribuant au développement du MB. Ce sont les études cytogénétiques qui ont fourni les premières informations concernant les altérations génomiques des PNETs. Cependant, à cause des difficultés reliées à l'obtention de métaphases de qualité, les données cytogénétiques demeurent encore assez limitées.

Selon les analyses cytogénétiques réalisées, l'anomalie la plus fréquente est l'isochromosome i(17q), retrouvée dans environ 30-50% des cas. Il en résulte une perte de séquences au niveau des bras courts du chromosome 17 et un gain de séquences des bras longs (17q) (Bigner *et al.*, 1988; Griffin *et al.*, 1988; Biegel *et al.*, 1989; Karnes *et al.*, 1992, Vagner-Capodano *et al.*, 1992, Neumann *et al.*, 1993; Fujii *et al.*, 1994). L'incidence élevée de cette anomalie a également

été confirmée par la cytogénétique moléculaire. Biegel *et al.* (1995) ont détecté la présence de l'isochromosome 17q (1 copie ou plus) par l'analyse du caryotype dans 29% des tumeurs PNETs/MBs, ainsi que dans 34% par la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). De plus, selon une étude par FISH sur les noyaux interphasiques de 20 MBs (tissus paraffinés), l'isochromosome 17q aurait été observé dans 100% les tumeurs (Giordana *et al.*, 1998). Des études par hybridation génomique comparative (CGH) ont montré que des gains du 17q, souvent associés avec des pertes du 17p, se retrouvaient dans 23% des cas analysés (Schütz *et al.*, 1996; Reardon *et al.*, 1997; Avet-Loiseau *et al.*, 1999) et Nicholson *et al.*, 1999). Par conséquent, ces études suggèrent la présence d'un gène suppresseur de tumeur en 17p, de même que l'augmentation du dosage d'un produit génique en 17q, tous deux potentiellement impliqués dans la tumorigenèse des PNETs/MBs. Toutefois, la perte du chromosome 17p a également été identifiée dans plusieurs autres types de tumeurs, incluant les carcinomes colorectaux, mammaires, du poumon, l'ostéosarcome, ainsi que dans d'autres tumeurs du SNC (Thomas et Raffel, 1991). Une série d'études, par approche moléculaire, confirment également la perte fréquente du 17p dans le MB, avec une incidence d'environ 30-45% (Raffel *et al.*, 1990; James *et al.*, 1990; Thomas et Raffel, 1991; Albrecht *et al.*, 1994; Blaeker *et al.*, 1996) et localisent une région chaude de perte d'hétérozygotie (LOH) en 17p13.3; locus distal au gène *TP53* (Biegel *et al.*, 1992; Cogen *et al.*, 1992; McDonald *et al.*, 1994; Batra *et al.*, 1995; Orellana *et al.*, 1998). Pour une visualisation des

bandes et des locus chromosomiques le long des bras courts du chromosome 17, voir à l'annexe, page 135.

En ce qui concerne le gène suppresseur de tumeur *TP53*, localisé en 17p13.1, il a représenté longtemps un candidat de choix pour le MB. En effet, comme je viens de le mentionné, la perte du locus 17p13 constitue l'anomalie génétique la plus fréquente dans le MB et le gène *TP53* correspond au gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les cancers adultes. D'ailleurs, il est impliqué dans la pathogenèse d'une fraction significative de gliomes adultes (von Deimling *et al.*, 1992; Tenan *et al.*, 1994). Cependant, le gène *TP53*, de même que le gène *RBI* (localisé en 13q14), ne semblent pas être affectés dans le MB (Cogen *et al.*, 1990, 1992; Saylor *et al.*, 1991; Ohgaki *et al.*, 1991; Badiali *et al.*, 1993; Adesina *et al.*, 1994; Barel *et al.*, 1997). En outre, les cancers pédiatriques sporadiques possèdent rarement des mutations à l'intérieur du gène *TP53* (Felix *et al.*, 1992; Vogan *et al.*, 1993). De plus, l'amplification du gène *MDM2* (*murine double-minutes-2*), localisé en 12q13-14 et rapportée par des études, comme facteur d'inactivation du *TP53* dans les tumeurs sans mutation, n'a pas été observée dans le MB (Batra *et al.*, 1995; Barel *et al.*, 1997).

Par conséquent, les données suggèrent la présence d'un autre gène suppresseur localisé au niveau du 17p et impliqué dans la tumorigenèse du MB. Ainsi, plusieurs gènes candidats du locus 17p13, distal à *TP53* (17p13.1), ont été isolés et étudiés pour leur potentiel de perte de fonction récessive, mais pour le

moment, aucun n'a été retenu. Par exemple, en ce qui concerne le gène *PEDF* (*pigment epithelium-derived factor*), cartographié dans la région de perte d'hétérozygotie (17p13.1-pter), aucune mutation n'a été détectée (Slavc *et al.*, 1997). De même que les gènes *ABR* (active *BCR*-related) (Cogen et McDonald, 1996), *LIS-1* (*lissencephaly gene-1*) et *RPH3AL* (*rabphilin-3A-like*) (Smith *et al.*, 1999), tous localisés en 17p13.3, sont également exclus comme gènes suppresseurs de tumeur candidats pour le MB. À l'heure actuelle, des études par génétique moléculaire sur les gènes *HIC-1* (*hypermethylated in cancer*), *OVCA1* (*DPH2L*) et *OVCA2* (gènes clonés à partir d'une région critique de délétion dans le cancer de l'ovaire), aussi cartographiés en 17p13.3, sont en progrès (Koch *et al.*, 1996, Pietsch *et al.*, 1997; Steichen-Gersdorf *et al.*, 1997).

Grâce aux études de délétions par cartographie, on a localisé dans les tumeurs PNETs/MBs, des points fréquents de cassures à l'intérieur d'une région plus centromérique du 17p, en 17p11.2, une région instable des bras courts entre les marqueurs D17S689 et D17S953 (Scheurlen *et al.*, 1997). Cette région est fréquemment délétée ou dupliquée chez les patients atteints du syndrome de Smith-Magenis (SSM). Ce syndrome est caractérisé par de multiples anomalies congénitales et un retard mental, sans augmentation du risque de développement de MB (Biegel, 1997). Cette bande chromosomique 17p11.2 est également associée à de nombreux désordres neurologiques et tumeurs malignes, et caractérisée, par la présence de séquences répétitives complexes qui sont probablement responsables de la fréquence élevée de délétions interstitielles, de

duplications ainsi que d'isochromosomes dans les tumeurs (Seranski *et al.*, 1999). Dans le même ordre d'idées, Scheurlen *et al.* (1999) ont récemment identifié, dans certains néoplasmes (dont le MB) pourvus d'un i(17q), quatre groupes de points fréquents de cassures au niveau des bras courts du chromosome 17 (17p): 1) à l'intérieur du centromère; 2) en 17p11.2, dans la région associée à la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A (*CMT1A*); 3) dans une région distale à ce locus; 4) à l'intérieur de la région du SSM. Par conséquent, l'identification de ces régions d'instabilités permettra éventuellement de déterminer le rôle et les mécanismes impliqués dans la formation de l'isochromosome 17q dans les tumeurs. De plus, le groupe de Seranski (1999) a identifié une série de nouveaux gènes candidats ainsi que 53 unités transcriptionnelles à l'intérieur de cette bande chromosomique 17p11.2., dans la région des points fréquents de cassures des tumeurs PNETs/MBs enveloppant la région critique du SSM. Toutefois, ces gènes candidats devront être analysés dans les tumeurs PNETs/MBs montrant une perte du 17p, afin de déterminer leur pouvoir réel dans la pathogenèse de ces tumeurs. L'implication du gain des bras longs du chromosome 17 (résultant de la formation de l'isochromosome 17q) dans le MB, sera discutée à la section 4.4.2.15 du Chapitre 4.

Puisque l'isochromosome 17q n'est présent que dans environ 30-50% des tumeurs PNETs/MBs, des régions chromosomiques additionnelles sont probablement impliquées dans la tumorigenèse de ces tumeurs. Ces autres

anomalies chromosomiques récurrentes seront considérées dans la section discussion (Chapitre 4) de ce mémoire.

1.6.5 L’empreinte parentale et le MB

Selon l’hypothèse de Knudson, la perte de fonction récessive contribuant à la formation d’une tumeur, exemple classique du rétinoblastome (section 1.5, page 12), nécessite au moins deux événements mutationnels. Depuis quelques années, certains mécanismes alternatifs de ce modèle classique ont été proposés. Selon les évidences acquises jusqu’à ce jour pour certains gènes, l’origine parentale de leur allèle influence leur expression. Ce phénomène semble résulter d’un processus épigénétique, que l’on appelle l’empreinte parentale, par lequel les chromosomes (ou les gènes) d’origine paternelle et maternelle possèdent un rôle fonctionnel différent. Dans le cas des gènes suppresseurs de tumeur, les mécanismes pathologiques impliqués dans ce processus sont basés sur la présence de gènes sujets à une empreinte parentale dans les régions chromosomiques délétées et sur la perte préférentielle d’allèles parentaux. Par exemple, si l’expression d’un allèle d’origine maternelle ou paternelle d’un locus suppresseur de tumeur est réduite ou absente (donc, expression monoallélique) due à une modification épigénétique de l’ADN (telle la méthylation), l’expression de ce gène sera inhibée par la perte de l’allèle restant (par délétion ou mutation). Il a été démontré que ce mécanisme existe aussi en ce qui concerne les proto-oncogènes (Feinberg, 1995). Dans ce cas-ci, il y a un relâchement (ex: par une déméthylation

de l'ADN) de ce phénomène d'empreinte. Ainsi les cellules cancéreuses, qui diminuent ou arrêtent leur production d'ADN-méthyltransférase, cessent d'inactiver les allèles des proto-oncogènes qui sont normalement sujets à une empreinte parentale. Par conséquent, en exprimant une double dose de ces proto-oncogènes, le développement des cellules devient plus agressif, favorisant l'émergence d'un clone plus malin.

En ce qui concerne le MB et l'isochromosome 17q, les gènes situés sur les bras courts de ce chromosome ne semblent pas être sous l'influence d'une empreinte parentale préférentielle. Dans les tumeurs MB analysées, on a détecté au niveau du locus 17p13 un pourcentage non significatif de délétions d'origine soit maternelle ou paternelle (Scheurlen *et al.*, 1995; Biegel et Wentz, 1997). Cependant, plusieurs cancers pédiatriques (pour une revue/ou pour un compte rendu voir Feinberg, 1995), tels la tumeur de Wilms (11p13) et le rétinoblastome (13q14), c'est l'allèle d'origine maternelle qui est le plus souvent délété.

Le gène *IGF2* (*insulin-like growth factor II*), mitogène foetal important et facteur autocrine dans certaines tumeurs, est exprimé seulement à partir de l'allèle paternel (empreinte maternelle). Alors que le gène *H19*, gène putatif suppresseur de tumeur, possède une expression maternelle (empreinte paternelle). Le groupe d'Albrecht *et al.* (1996) a montré qu'il y a une perte de l'empreinte parentale (donc, expression biallélique) des gènes *IGF2* et *H19* (localisés dans le domaine 15p15.5) dans les lignées cellulaires MB et les tumeurs primaires MB, mais

également dans le cervelet foetal normal. Alors, ce phénomène de perte de l’empreinte parentale (LOI) dans le MB semble refléter la nature embryonnaire de la tumeur plutôt qu’un mécanisme pathogénétique primaire, jouant un rôle majeur dans la croissance ou la progression du MB.

1.6.6 Les gènes de régulation et le MB

L’origine du MB résulte probablement d’un dysfonctionnement dans le processus normal de développement du cervelet. Par conséquent, l’identification des gènes de régulation, impliqués dans la croissance normale et la différenciation peut également nous fournir des informations importantes sur l’étiologie des PNETs/MBs (Rorke *et al.*, 1997). Les facteurs de transcription neurogéniques de la famille hélice-boucle-hélice (bHLH) est un groupe de gènes impliqués dans la régulation de la différenciation neuronale. Il est connu que la famille des gènes *NEUROD*: *NEUROD1* (2q32), *NEUROD2* (17q12) et *NEUROD3* (5q23-31) montre, au niveau du cerveau en développement, des patrons d’expressions distincts (Biegel, 1997). Selon de récents résultats, les PNETs/MBs (et non les tumeurs gliales) exprimeraient un ou plusieurs de ces gènes (Rostomily *et al.*, 1997). Le groupe de Reardon (1997) a détecté par CGH un gain de la région distale du chromosome 5q dans 17% des échantillons MBs, suggérant la possibilité que le gène *NEUROD3* soit amplifié dans un sous-groupe de MBs. De plus, il est possible que l’expression ou la fonction du gène *NEUROD2* (17q12) puisse être également affectée par les réarrangements associés à la formation de l’isochromosome 17q. Il y a également les gènes de la famille *PAX* (*paired box*

containing genes) qui codent pour des facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la migration des cellules du cerveau. Une étude a montré par hybridation *in situ* (HIS) que l'ARNm du gène *PAX5* était exprimé dans 75% des MBs (Giangaspero *et al.*, 1997). *PAX5* n'est normalement pas exprimé dans les cervelets néonataux, ce qui suggère qu'il y a une perte de contrôle de la régulation de ce gène (activation et surexpression) lors du développement tumoral du MB (Kozmik *et al.*, 1995). L'étude de ces facteurs de transcription (et autres) est en progrès, afin de déterminer s'ils ont réellement un rôle dans la tumorigenèse ou bien s'ils sont simplement des marqueurs de différenciation de la tumeur en développement (Biegel, 1997).

1.6.7 Les gènes apoptotiques et le MB

Le rôle déterminant du phénomène apoptotique dans le développement normal du SNC, dans l'oncogenèse des néoplasies hématopoïétiques ainsi que dans la réponse thérapeutique, supporte l'hypothèse que l'altération des processus apoptotiques peut également contribuer à la perte du contrôle de la croissance cellulaire dans les tumeurs cérébrales (Bruggers *et al.*, 1999). L'apoptose est une forme de mort cellulaire distincte, manifestée par une séquence d'événements cellulaires caractéristiques, impliquant la condensation nucléaire, la fragmentation internucléosomale de l'ADN ainsi qu'une vacuolisation cytoplasmique. La susceptibilité des cellules à rentrer en mort cellulaire programmée (apoptose) après un stimulus apoptotique est médiée par l'expression d'une famille complexe

de gènes, incluant *TP53* (17p13.1), *BAX*, *BCL2* (18q21) et *BCLX* (*BCLX_L* et *BCLX_S*.) L'expression relative des gènes pro-apoptotiques (*BAX* et *BCLX_S*) et anti-apoptotiques (*BCL2* et *BCLX_L*) semble déterminer le devenir de la cellule après un stimulus cellulaire apoptotique (Bruggers *et al.*, 1999). Par des analyses immunohistochimiques effectuées sur 16 MBs, les protéines Bcl-2, Bcl-X et Bax se sont avérées immunopositives dans 25%, 56% et 100% des cas, respectivement (Krajewski *et al.*, 1997). Le faible niveau ou l'absence d'expression de Bcl-2 détecté dans les MBs/lignées MBs appuie les analyses antérieures de Reed *et al.* (1991), ainsi que de Schiffer *et al.* (1996). Selon les résultats du groupe de Bruggers (1999), les trois lignées cellulaires MBs étudiées (D283 MED, D425 MED et DAOY) montrent une co-expression des gènes *BCLX_L* et *BAX* alors, que les gènes *BCL2* et *BCLX_S* ne sont pas exprimés. Leurs travaux suggèrent donc que l'expression relative de ces deux groupes compétiteurs de gènes est plus important dans l'oncogenèse neuronale que l'expression (sans opposition) d'un seul groupe. Ainsi, la co-expression des gènes anti-apoptotiques *BCLX_L* et *BCL2* n'implique pas nécessairement l'inhibition de l'apoptose dans les cellules où le gène *BAX* n'est pas fortement exprimé. Par conséquent, l'élaboration des processus oncogéniques requièrent plus vraisemblablement, la coopération de l'expression aberrante des gènes apoptotiques avec l'activation d'oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (Bruggers *et al.*, 1999).

1.6.8 Traitement et pronostic

Premièrement, l'évaluation du stade de la maladie post-opératoire (e.g. tumeur résiduelle) va grandement influencer le traitement ainsi que le pronostic du MB (Pollack, 1999). Les facteurs de mauvais pronostic sont de trois ordres: 1) la dissémination des cellules tumorales, 2) une taille significative de la tumeur résiduelle ($> 1,5 \text{ cm}^2$) ainsi que 3) l'âge du patient (3 ans et moins). Par conséquent, la présence de n'importe lequel de ces facteurs situe le patient dans la catégorie à risque élevé (Albright *et al.*, 1996). Historiquement, l'espérance de vie à 5 ans des enfants situés dans la catégorie à risque élevé (traités par radiothérapie craniospinale) est moins de 30%, comparativement à 60-80% pour ceux situés dans la catégorie à risque standard. (Pollack, 1999) De façon inattendue, l'administration de CCNU (combinaison de vincristine sulfate et de lomustine), de cisplatine et de vincristine aux patients à risque élevé fournit actuellement un taux de survie supérieur aux patients à risque standard traités uniquement avec radiothérapie (Packer, 1999). Par conséquent, les nouvelles stratégies de traitement combinent une réduction des doses de radiothérapie avec de la chimiothérapie, prolongeant ainsi l'espérance de vie à 5 ans des patients à risque standard à 82-85% (Haslam *et al.*, 1998; Pollack, 1999). En addition, le raffinement des traitements chirurgicaux et radiologiques a également contribué à l'amélioration des résultats (Calaminus *et al.*, 1998).

Une nouvelle ère vient d'arriver dans la thérapeutique des cancers, où les techniques de la biologie moléculaire peuvent être appliquées aux traitements: la thérapie génique. Le terme "thérapie génique" se rapporte spécifiquement à la restauration du génome, afin d'effectuer des changements spécifiques au niveau du phénotype des cellules altérées. Les PNETs sont sujettes à des stratégies de thérapie génique dans le futur, de par leur potentiel prolifératif élevé, leur tendance à se propager à l'intérieur des voies du LCR, ainsi que par leur taux de récurrence élevé (Raffel, 1996).

1.6.8.1 Séquelles causées par la thérapeutique

La majorité des séquelles retrouvées chez les enfants atteints de tumeurs cérébrales se manifeste plusieurs années après le diagnostic. Des mesures séquentielles du quotient intellectuel (QI), chez les enfants de moins de 7 ans ayant reçu de la radiothérapie, ont démontré une détérioration progressive de leur capacité intellectuelle durant les deux premières années après le traitement (Ellenberg *et al.*, 1987). De plus, les endocrinopathies sont extrêmement fréquentes chez les enfants traités par des agents chimiques. On remarque également une augmentation de l'incidence des malignités hématologiques après chimiothérapie. Chez la majorité des enfants ayant subi de la radiation au niveau du cerveau entier, on note une diminution du taux d'hormone de croissance. L'irradiation spinale ainsi que la chimiothérapie peuvent également conduire à

des déficiences endocriniennes primaires, telle une dysfonction thyroïdienne et gonadique (Pollack, 1999).

1.6.9 Marqueurs de pronostic

Bien que de nombreux laboratoires, par une variété d'approches stratégiques, sont à la recherche d'événements moléculaires pouvant prédire l'issue clinique des enfants atteints d'un MB, aucun marqueur biologique valable n'a encore été identifié.

Même si l'analyse chromosomique de tumeurs MB a montrée que l'isochromosome 17q était l'anomalie chromosomique la plus fréquente (donc marqueur potentiel par excellence), jusqu'à présent, il ne semble pas être associé à aucun stade métastatique particulier, ni à aucun diagnostic histologique donné, ni même à aucun état de différenciation spécifique (Biegel *et al.*, 1997; Rorke *et al.*, 1997). La perte du 17p comme marqueur de pronostic demeure controversé. En effet, certaines études ont démontré que la perte d'hétérozygotie du 17p est associée à une espérance de vie plus courte (Cogen *et al.*, 1991-1992; Batra *et al.*, 1995) ou à un mauvais pronostic (Steichen-Gersdorf *et al.*, 1997), ainsi qu'à des tumeurs de stade métastatique (Scheurlen *et al.*, 1998); alors que le groupe d'Emadian *et al.*(1996) n'a noté aucune corrélation entre la perte chromosomique du 17p et le devenir clinique des patients atteints d'un MB.

Puisque la présence d'isochromosome 17q, dans une portion significative de MB, résulte en la formation de deux bras longs du chromosome 17, l'oncogène *HER2/neu/ERBB2*, cartographié en 17q11.2-q12, se retrouve dupliqué. Cet oncogène est reconnu pour être impliqué dans la tumorigenèse de nombreux cancers et plus particulièrement dans le cancer du sein. Le groupe de Gilgertson (1995) a montré que le produit de l'oncogène *c-erbB-2* est exprimé dans la majorité des MBs. Dans cette étude immunohistochimique rétrospective de 55 MBs, les patients dont les cellules tumorales expriment la protéine *c-erbB-2* à plus de 50%, présentent de façon significative un mauvais pronostic. Bien que le mécanisme de surexpression de *c-erbB-2*, contribuant à la malignité ne soit pas encore tout à fait compris, la confirmation de ces résultats, tenant compte du stade de la maladie ainsi que du traitement suivi, pourra peut-être fournir un moyen pour identifier les patients à risque élevé de récurrence (Biegel, 1997).

L'amplification du gène *c-myc* peut-être un autre marqueur de pronostic potentiel dans le MB. En effet, les groupes de Badiali (1991) et de Batra (1995) ont détecté une amplification du gène *c-myc* dans trois MBs sur 43 (6.9%). Ces 3 patients sont décédés à l'intérieur d'une période de 9 mois (Scheurlen *et al.*, 1998). De plus dans d'autres études, l'amplification de cet oncogène dans les tumeurs MBs a été également corrélée à un comportement biologique agressif (Scheurlen *et al.*, 1996; Schütz *et al.*, 1996). Ainsi à la lumière de ces études, il semble que l'amplification de *c-myc* soit associée à un mauvais pronostic. Récemment, l'expression du gène *N-myc* a été corrélée à la primitivité des

cellules MBs (cellules peu différenciées) (ainsi, une diminution de son expression serait associée à la différenciation cellulaire); ce qui pourrait, par conséquent, être un autre facteur de pronostic potentiel chez les patients atteints d'un MB (Moriuchi *et al.*, 1996; 1997). Toutefois, seulement un faible pourcentage de tumeurs MBs montre une telle amplification génique, que ce soit pour le gène *c-myc* ou *N-myc* (Fuller et Bigner, 1992). Pour plus de précision sur ce phénomène, voir la section 4.4.1, Chapitre 4.

Il est reconnu que le niveau de ploïdie (contenu en ADN) de plusieurs cancers pédiatriques fournit des indications valables sur le pronostic clinique des patients. D'ailleurs, les sarcomes embryonnaires et les leucémies lymphoblastiques aiguës hyperploïdes (47-57 chromosomes) sont associés à un meilleur pronostic (Tait *et al.*, 1993). En ce qui concerne les tumeurs PNETs/MBs, les résultats sont contradictoires (Yasue *et al.*, 1989; Zerbini *et al.*, 1993; Gilbertson *et al.*, 1997). Ainsi aucune association valable n'a encore été identifiée.

Le degré d'apoptose détecté dans les spécimens tumoraux, obtenus après l'initiation de la thérapie cytotoxique, peut également contribuer à l'évaluation du pronostic des patients, et ceci par l'évaluation de la capacité de ces tumeurs à répondre aux traitements. Il a été montré que les tissus MBs avec un index apoptotique (IA) élevé au diagnostic sont associées à un devenir clinique favorable, indépendamment de la catégorie à risque du patient (Haslam *et al.*,

1998). De plus, selon cette étude, l'IA semble être plus propice (que les méthodes courantes) pour le choix d'une thérapie optimale, et spécialement chez les enfants classifiés dans la catégorie à faible risque après chirurgie. Dans le même ordre d'idées, il a été révélé que le pourcentage de l'index mitotique (PIM) pouvait également constituer un facteur de pronostic valable pour les enfants atteints d'un MB (Gilbertson *et al.*, 1997).

Il est connu que les neurotrophines et leurs récepteurs sont impliqués dans la différenciation, la croissance cellulaire ainsi que dans les processus apoptotiques du cervelet en développement. En ce qui concerne les PNETs/MBs, ces derniers expriment au moins un des types de neurotrophines (NGF, BDNF, NT3) et de récepteurs à neurotrophines (p75, TrkA, TrkB, TrkC) (Muragaki *et al.*, 1997; Biegel, 1997). De façon intéressante, on note une espérance de vie plus longue chez les patients atteints d'un MB dont les niveaux de TrkC sont élevés, par rapport aux patients avec des tumeurs possédant de faibles niveaux de TrkC (Segal *et al.*, 1994). En fait, il semblerait que les actions biologiques de TrkC affecteraient de façon favorable le comportement de la tumeur, en inhibant sa croissance tumorale par apoptose (Kim *et al.*, 1999).

De plus, selon des travaux effectués sur trois lignées cellulaires de MB (DAOY, MED-1, D283 MED), le ligand CD95 (CD95L), une cytokine cytotoxique homologue au TNF- α (tumor necrosis factor- α), induit le processus d'apoptose dans les cellules MBs, lorsque la synthèse d'ARN et de protéines est

inhibée (Weller *et al.*, 1998). Par conséquent, l'union d'une immunochimiothérapie ciblant CD95L à l'utilisation d'agents chimio-thérapeutiques appropriés annonce une approche expérimentale potentielle, valable pour les patients atteints d'un MB (classés dans la catégorie à faible risque).

1.6.10 Développement des lignées cellulaires PNETs/MBs

Dans le passé, le MB a été une tumeur très difficile à étudier, en partie à cause des problèmes techniques limitant la quantité de lignées cellulaires disponibles. Jusqu'à présent, on note dans la littérature l'établissement et la caractérisation d'environ seulement une vingtaine de lignées cellulaires dérivées de PNETs/MBs, telles que D283 MED, D341 MED, D384 MED, D425 MED, D458 MED, DAOY, ONS-76, ONS-81, MHH-MED 1-4, MCD-1 et Dev (Friedman *et al.*, 1983, 1985, 1988; Jacobsen *et al.*, 1985; Trojanowski *et al.*, 1987; Tamura *et al.*, 1989; He *et al.*, 1989, 1991; Pietsch *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1996; Derrington *et al.*, 1998). En ce qui concerne la lignée TE671, l'une des premières lignées cellulaires MBs établies (McAllister *et al.*, 1977), elle dérive en fait d'un rhabdomyosarcome (Trojanowski *et al.*, 1992). Récemment, quatre lignées cellulaires PNETs ont été dérivées de tumeurs neuronales induites par transfection de l'antigène grand T du rétrovirus SV40, à partir de transplants cérébraux foetaux de rats (Weggen *et al.*, 1997). Ces modèles *in vitro* constituent un système d'étude permettant d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes qui régissent l'origine cellulaire, l'apoptose, la prolifération, ainsi

que les voies de différenciation cellulaire impliquées dans les tumeurs PNETs/MBs. Toutefois, la caractérisation cytogénétique de la majorité de ces lignées cellulaires PNETs/MBs est soit incomplète ou n'a pas fait l'objet d'études. Ainsi, à la lumière de ces données, les anomalies chromosomiques retrouvées dans ces lignées seront abordées dans la section discussion (Chapitre 4) de ce manuscrit.

1.7 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES DU PRÉSENT TRAVAIL

L'identification des gènes impliqués dans le développement et la progression des tumeurs permet une meilleure compréhension pathogénétique des cancers. La détection des anomalies chromosomiques récurrentes et spécifiques constitue la première étape de cette caractérisation génétique. D'une manière générale, l'étude cytogénétique des tumeurs solides à partir d'un spécimen frais demeure limitée et ceci est causé en grande partie par la difficulté d'obtenir des préparations chromosomiques de qualité. De plus, à cause de la difficulté de culture des cellules tumorales, l'analyse chromosomique des tumeurs PNETs/MBs donne trop souvent des caryotypes normaux ou des caryotypes partiellement analysables (Griffin *et al.*, 1988; Biegel *et al.*, 1989; Sawyer *et al.*, 1991; Karnes *et al.*, 1992; Neumann *et al.*, 1993; Fujii *et al.*, 1994; Agamanolis *et al.*, 1995). Par conséquent, l'analyse combinée de la cytogénétique classique et moléculaire, appliquée aux cellules tumorales, constitue une approche clef pour l'identification des anomalies chromosomiques dans le MB, facilitant ainsi

l'identification de régions chromosomiques spécifiques et ultérieurement, des gènes impliqués dans sa tumorigenèse. De plus, à notre connaissance, parmi les lignées cellulaires PNETs/MBs présentement disponibles, l'analyse chromosomique comparative classique-moléculaire (FISH et CGH/mCGH) d'aucune de ces lignées n'a été accomplie. Ainsi, le but de ce projet d'étude est d'effectuer une caractérisation cytogénétique détaillée de la lignée cellulaire humaine de médulloblastome UM-MB1, à l'aide de la cytogénétique conventionnelle par l'analyse du caryotype et moléculaire par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) et hybridation génomique comparative modifiée (mCGH). Afin d'atteindre ce but ultime, nous avons effectué notre recherche en l'étayant sur les objectifs spécifiques suivants:

- 1) établir le caryotype représentatif (du clone principal) de la lignée UM-MB1;
- 2) identifier toutes les anomalies chromosomiques et détecter les régions chromosomiques sur-représentées (en excès) et sous-représentées (pertes) par cytogénétique conventionnelle (CT), hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) et par hybridation génomique comparative modifiée (mCGH);
- 3) déterminer les gains et les pertes chromosomiques par l'analyse combinée des trois approches mentionnées ci-haut;
- 4) et finalement, répertorier les régions chromosomiques susceptibles d'être impliquées dans la pathogenèse du MB.

Les travaux de recherche qui nous ont permis d'atteindre nos objectifs sont présentés dans l'article qui constitue le troisième chapitre de ce mémoire. Puisque la méthodologie employée dans cette étude n'est que brièvement exposée dans l'article, le prochain chapitre présente les principes ainsi que quelques précisions supplémentaires: d'abord, sur l'établissement de la lignée UM-MB1, l'obtention des chromosomes, suivi de l'analyse cytogénétique conventionnelle et moléculaire (FISH et mCGH).

CHAPITRE 2
MÉTHODOLOGIE

2. MÉTHODOLOGIE

2.1 ÉTABLISSEMENT DE LA LIGNÉE CELLULAIRE UM-MB1

La lignée cellulaire UM-MB1 a été établie par les Drs Yves Théorêt, Constantin Tautu et Jean Michaud de l'Hôpital Sainte-Justine (Montréal). Cette nouvelle lignée cellulaire dérive d'une tumeur MB excisée de la fosse postérieure d'une patiente âgée de 4 ans, obtenue par craniotomie (Kenigsberg *et al.*, 1997). L'aspect ainsi que l'analyse histologique de cette tumeur sont présentés à la Figure 1, pages 41 et 42. L'échantillon tumoral stérile est d'abord tranché finement et puis dissocié mécaniquement afin d'obtenir des cellules isolées. Par la suite, les cellules sont mises en culture dans des flacons T25 (Falcon, Becton and Dickinson, Mississauga, Ontario, Canada) contenant du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplémenté avec 10% de sérum foetal de veau (Gibco) et 1% de pénicilline/streptomycine (Sigma). Les cellules sont incubées dans une étuve à 37°C saturée à 5% de CO₂. Le milieu est renouvelé lorsque les cellules se divisent activement (généralement aux 2 jours). Lorsqu'elles arrivent à confluence, il est nécessaire de les trypsiniser, de les subdiviser et de les remettre en culture (ce qui correspond à un passage). Les cellules en culture de la lignée UM-MB1 poussent d'une façon caractéristique; elles forment des foyers d'agrégats (en mi-suspension) et adhèrent faiblement au flacon (Figure 2). De plus, la tumorigénicité des cellules UM-MB1 a été vérifiée *in vivo*, chez les souris nues, par le groupe du Dr. Tautu (Département de pathologie, Université de Montréal). Selon ces travaux (non publiés), il semble

Figure 1. Le médulloblastome: analyse phénotypique.

A) et B) Foyers d'aspect multinodulaire comportant d'abondantes fibres de réticuline et de collagène, typiques d'une différenciation desmoplasique focale. Coloration de HPS, 100 X .

C) Aspect histologique classique; région de différenciation neuroblastique avec rosettes de type d'Homer-Wright. Coloration de HPS, 200 X.

D) Forte immunoréactivité à la synaptophysine (marqueur neuronal) par la technique indirecte d'immunopéroxydase de Sternberger; trait caractéristique des tumeurs MBs. 200 X.

E) PCNA/cycline-contrôle; centre germinatif réactionnel d'une amygdale réséquée de façon préventive chez un jeune patient. 100 X.

F) Tumeur MB positive pour la PCNA/cycline; distribution cellulaire du marquage en accord avec un index prolifératif très élevé. 100 X.

* Matériel histologique offert par le Dr.Yves Robitaille, neuropathologiste, Hôpital Sainte-Justine, Montréal.

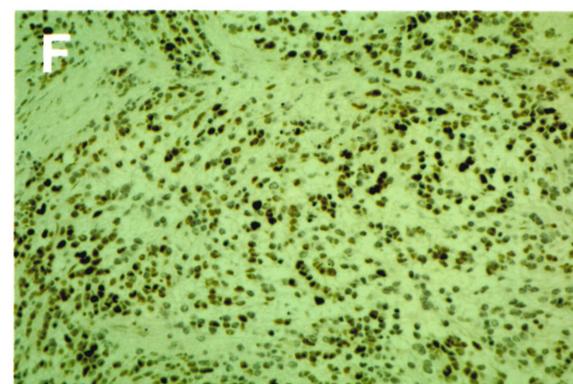
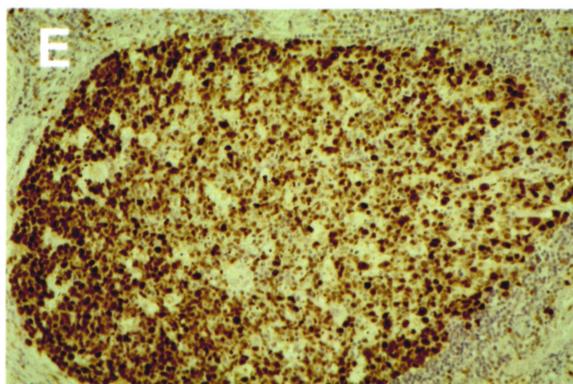
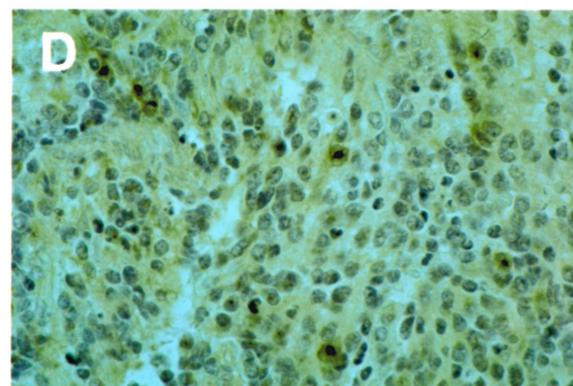
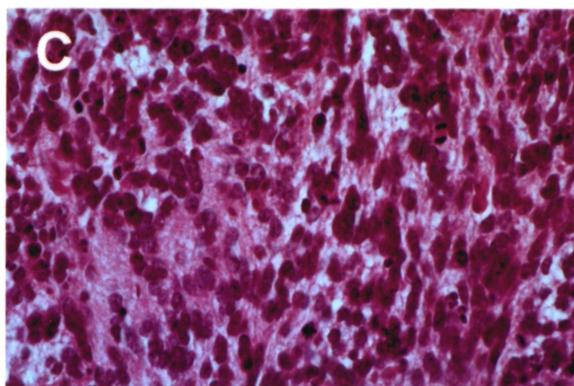
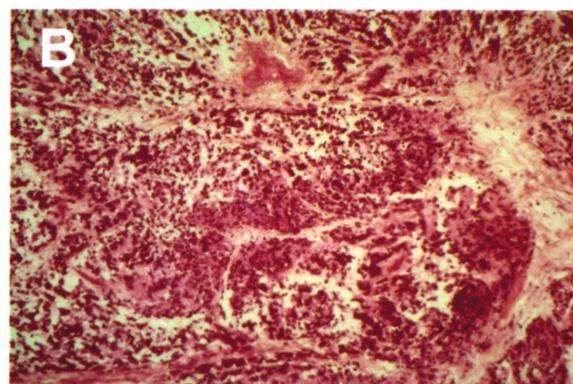
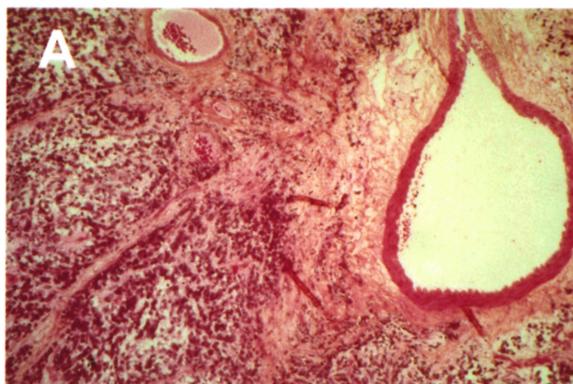


Figure 1

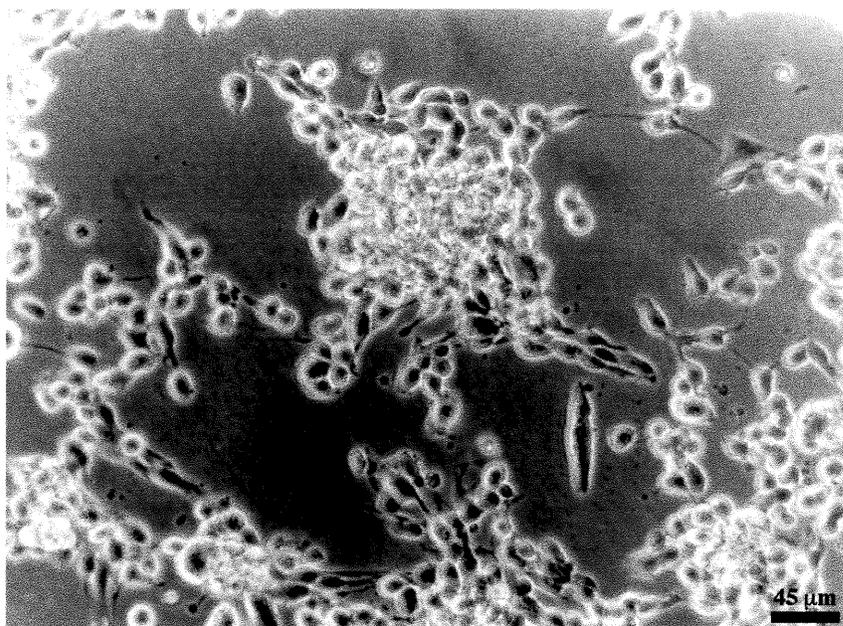


Figure 2. Lignée cellulaire UM-MB1 en culture (passage 53).

que les cellules UM-MB1 xénogreffées en sous-cutané ou intracérébral ont la capacité de se multiplier et de former des masses tumorales. Grâce à l'établissement de cette lignée, nous avons pu, par l'analyse conjointe de la cytogénétique classique et moléculaire, obtenir et étudier précisément les chromosomes ainsi que l'ADN de cette tumeur.

2.1.1 L'obtention des chromosomes

Habituellement, la mise en culture des cellules tumorales et l'obtention de bonnes préparations chromosomiques sont plus difficiles que celles des lymphocytes humains (stimulés par la phytohémagglutinine -PHA-) (Murex Biotech Ltd. Dartford, England). Dans ce travail, afin d'obtenir un indice mitotique élevé, les cellules de la lignée UM-MB1 sont récoltées 24h après la dernière sous-culture. De plus, l'ajout de colcemide (Canadian Life Technologies) (inhibiteur des fibres du fuseau mitotique) pendant 4 heures favorise l'accumulation des cellules tumorales en métaphase (stade du cycle cellulaire où les chromosomes sont les mieux individualisés). Par la suite, afin de disperser les chromosomes au moment de l'étalement sur lames, les cellules sont incubées dans une solution hypotonique (KCL 0.075M, à 37°C pendant 1 heure) (Lemieux et Richer, 1989). Ceci est la récolte chromosomique proprement dite.

2.2 CYTOGÉNÉTIQUE CONVENTIONNELLE: L'ANALYSE CARYOTYPIQUE

Après l'obtention d'étalements chromosomiques (riches et analysables), l'étude du caryotype de la lignée UM-MB1 est accomplie après marquage chromosomique en bandes GTG (bandes G obtenues par l'action de la trypsine, colorées au Giemsa). Des caryotypes sont effectués aux passages 10, 23, 107 (Kenigsberg *et al.*, 1997), ainsi qu'aux 53 et 139ième. Puisque les expériences d'hybridation *in situ* nécessitent des lames riches et de qualité en étalements chromosomiques, le passage 53 a été choisi pour nos analyses cytogénétiques moléculaires.

2.3 CYTOGÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE:

2.3.1 L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

Par le processus d'hybridation, c'est-à-dire par l'appariement de deux séquences nucléotidiques complémentaires, il est possible d'identifier une séquence marquée et connue (sonde), complémentaire à une portion plus ou moins grande du génome. Au cours de notre étude, pour la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), deux types de sondes ont été appliqués sur les chromosomes tumoraux de la lignée UM-MB1 (passage 53).

1) Des sondes spécifiques sont utilisées pour chacun des chromosomes entiers; elles sont appelées peintures chromosomiques ou "chromosome paintings"

(Oncor, Gaithersburg, MD, USA; Roche Diagnostics, Borehringer Mannheim, Canada; VYSIS, Downers Grove, USA). Ces sondes sont fabriquées à partir de l'ADN total d'une banque spécifique pour un chromosome donné. Cette approche facilite l'identification ainsi que l'analyse des remaniements chromosomiques numériques ou structuraux. 2) Des sondes uniques sont utilisées pour la détection ponctuelle des gènes *c-myc* (8q24), *N-myc* (2p24) et *TP53* (17p13.1) (Oncor, Gaithersburg, MD, USA). Lors de la visualisation au microscope, les chromosomes sont colorés à l'iodure de propidium (PI) et les sondes sont couplées à la biotine-FITC (fluorescéine isothiocyanate) (Lemieux *et al.*, 1992).

2.3.4 L'hybridation génomique comparative:

Technique originale (CGH) et modifiée (mCGH)

L'hybridation génomique comparative ou CGH (technique originale), initialement décrite par Kallioniemi *et al.* (1992, 1994), permet de détecter en une seule expérience (sans analyser le caryotype correspondant et sans l'utilisation de sondes particulières) les changements du nombre de copies des séquences d'ADN (perte, délétion, duplication, amplification) dans un génome donné (tel un échantillon d'ADN tumoral) et de localiser ces régions sur des chromosomes normaux.

Cette technique est basée sur l'hybridation simultanée (*in situ*) de 2 sondes, marquées par des haptènes différents, sur des préparations métaphasiques

normales. L'ADN génomique tumoral (sonde #1), extrait de la tumeur à analyser, est marqué à la biotine; alors que l'ADN génomique de référence (sonde #2), extrait d'un tissu normal, est marqué à la digoxigénine. De plus, l'hybridation se fait en présence d'ADN Cot-1, afin d'empêcher l'hybridation non spécifique des séquences répétées, présentes en nombre différent de copies dans l'ADN normal et tumoral. Par la suite, les deux sondes sont révélées par des fluorochromes différents, le FITC (vert) pour l'ADN tumoral et le Texas Red (rouge) pour l'ADN de référence. Puisque l'hybridation de chaque fragment d'ADN avec son locus chromosomique homologue dépend de sa concentration, une différence dans le nombre de copies d'ADN entre la sonde tumorale et la sonde de référence (pour un locus donné) conduira à différentes quantités de sondes hybridées. L'intensité des fluorescences verte et rouge est ensuite quantifiée le long de chaque chromosome à l'aide d'un système d'analyse d'images. Ainsi, un rapport de fluorescence vert/rouge augmenté indique une région chromosomique sur-représentée (gain ou amplification) dans la tumeur, alors qu'un rapport diminué reflète une perte de matériel génétique (perte ou délétion) (Figure 3).

Dans ce travail, nous avons utilisé une modification de cette technique originale, le mCGH (*modified comparative genomic hybridization*), décrite par Muleris *et al.* en 1994. Cette technique est basée sur les mêmes principes que la technique originale (CGH); cependant, seulement la sonde tumorale est marquée (par un haptène) et révélée (par un fluorochrome) (Figure 4). Dans cette étude, l'ADN génomique de la lignée UM-MB1 au passage 53 a été marquée par la

biotine couplée au FITC (vert). Ainsi, les zones intenses de fluorescence indiquent les régions chromosomiques sur-représentées dans la lignée UM-MB1. Selon cette méthodologie, la perte de matériel génétique est représentée par une absence de signal. Toutefois, cette détection reste difficile à cause d'une part de la contre-coloration des chromosomes en rouge par le PI, ainsi que par la présence de bruits de fond. Par conséquent, cette technique nous permet de détecter plus facilement que les régions chromosomiques en excès en utilisant un microscope à épifluorescence conventionnel, sans recourir à un système d'analyse d'images.

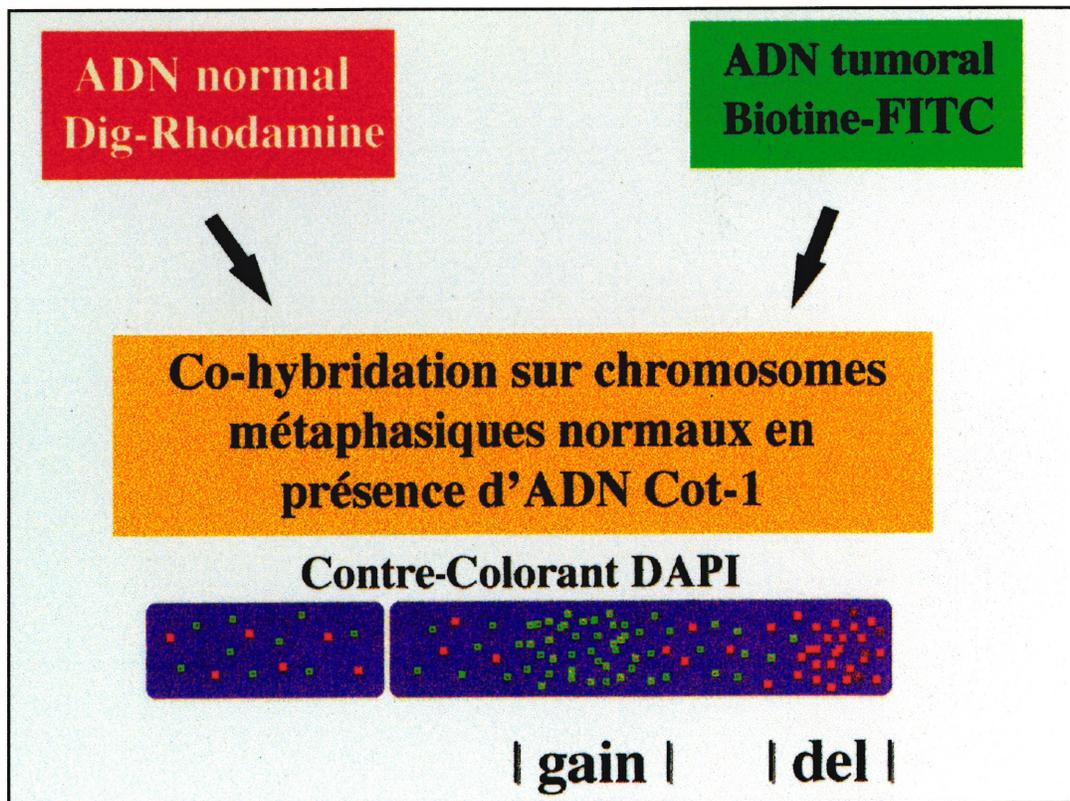


Figure 3. Représentation schématique de la technique d'hybridation génomique comparative (CGH).

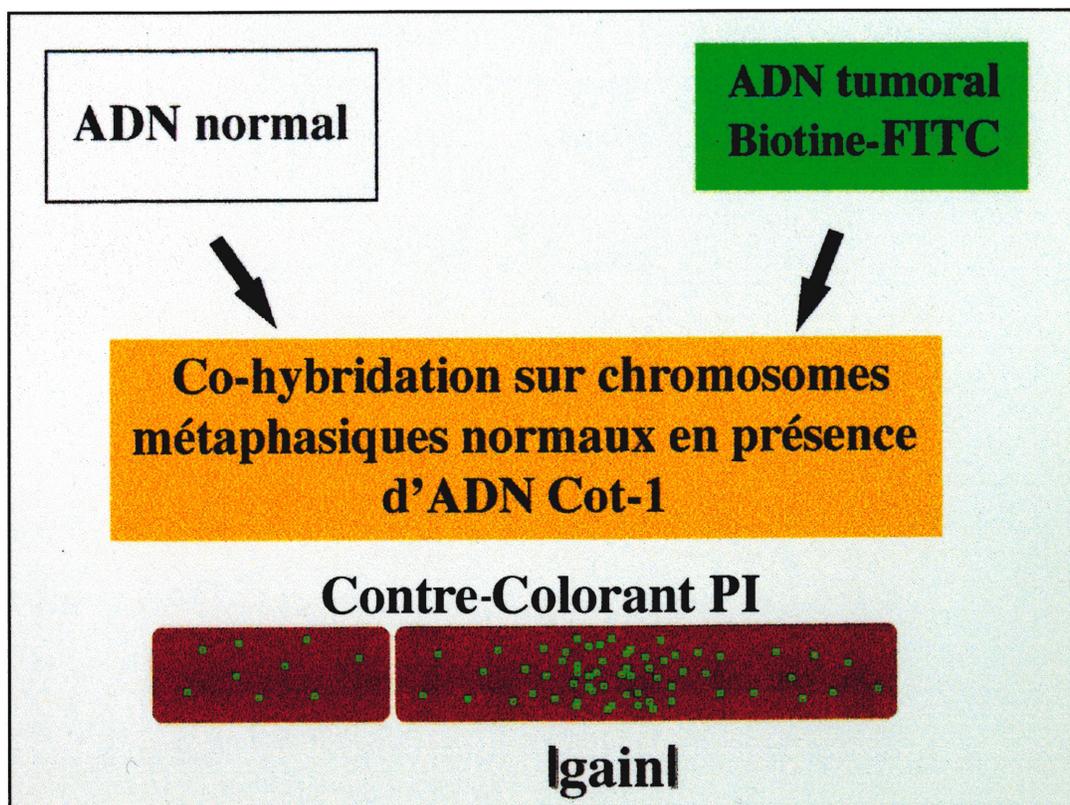


Figure 4. Représentation schématique de la technique d'hybridation génomique comparative modifiée (mCGH).

CHAPITRE 3

**Caractérisation cytogénétique de la lignée cellulaire humaine de médulloblastome
UM-MB1 par l'analyse combinée de l'hybridation génomique comparative modifiée
et de l'hybridation *in situ* en fluorescence**

**"Molecular Cytogenetic Characterization of the Human Medulloblastoma Cell Line
UM-MB1 by Combined Modified Comparative Genomic Hybridization and
Fluorescence *In Situ* Hybridization Analysis"**

(Article en préparation pour publication dans "Cancer Genetics and Cytogenetics")

**Molecular Cytogenetic Characterization of the Human Medulloblastoma
Cell Line UM-MB1 by Combined Modified Comparative Genomic
Hybridization and Fluorescence *In Situ* Hybridization Analysis**

France Léveillé, Yves Théorêt, and Nicole Lemieux

Abbreviated title: Molecular Cytogenetic of the UM-MB1 Cell Line

*Centre de recherche (F. L., N. L.), Centre de cancérologie Charles Bruneau
(Y. T.) et Département de pathologie (N. L.), Hôpital Sainte-Justine, Montréal,
Québec, Canada; Département de pathologie et de biologie cellulaire,
Laboratoire de cytogénétique moléculaire (F. L., N. L.), Université de Montréal,
Québec, Canada.*

*Address reprint requests to: Dr Nicole Lemieux, Département de pathologie
et de biologie cellulaire, Laboratoire de cytogénétique moléculaire, Université
de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3J7,
Canada. [e-mail: nicole.lemieux@umontreal.ca Tel.: (514) 343-6309 Fax.:
(514) 343-5755]*

ABSTRACT:

Several studies demonstrated numerous non-randomly chromosomal abnormalities in medulloblastoma (MB). However, the specific oncogenic events involved in the development and progression of this tumor remain uncertain. Molecular cytogenetic approaches were performed to allow a more comprehensive cytogenetic evaluation of the previously established UM-MB1 cell line. The cytogenetic analysis revealed near-tetraploid mainline karyotype with 75 chromosomes and many clonal aberrations. Using combined modified comparative genomic hybridization (mCGH) and fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques we identified and mapped gains and losses of complete and partial chromosomal regions in the UM-MB1 cell line. The recurrent over-represented regions included the chromosome arms 15q (80%) and 22q (60%), regions 7q11.2→qter (60%), 12q22→qter (28%), 17q21→qter (28%), and DNA loci in 2q34→q36 (26%) and 2p22→p24 (22%). The specific genomic losses observed by chromosomal banding and FISH analysis involved the chromosomes arms 9p (no copy), 16q11.2→qter (2 copies), 17q21→pter (2 copies), and distal regions of chromosomes 10q (2 copies), 11p (2 copies), and 11q (2 copies). These results reveal many clonal imbalances that were previously reported, including some potentially important novel changes. The detailed chromosomal features of UM-MB1 cell line are argued to bring additional and useful information relative to the pathogenesis of MB.

INTRODUCTION

It is believed that the multistep nature of cancer is the result of specific genetic changes and that the identification of these genes involved in the development and progression of tumors should be first done by the detection of specific chromosomal abnormalities [1]. Previous cytogenetic studies of medulloblastoma (MB), the prototype of cerebellar primitive neuroectodermal tumors (PNETs), demonstrated that the most frequent structural abnormality, present in about 25-50% of cases, is i(17q) [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]. This marker represents a loss of sequences on 17p as well as a gain of sequences on 17q that suggest a role in the initiation and development of this tumor. Molecular approaches, attempting to narrow down a critical region of tumor suppressor locus on 17p, identified a common region of deletion, distal to TP53 locus, on 17p13.3, and confirmed this frequent loss in 37-44% of the MB studied [9, 10, 11, 12, 13]. Furthermore, it was also shown through karyotypic analysis, molecular cytogenetics or molecular approaches that in PNET/MB tumors several other non-random chromosomal aberrations are present. Frequent changes involved numerical and/or structural abnormalities of chromosomes 1, 6, 7, 8, 9, 12, including specific losses of 10q, 11, 16q, 22 and sex chromosome. [2, 3, 4, 5, 7, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27]. On the other hand, DNA amplification were observed through CGH analyses on chromosome bands 3p21-p23 [27], 3p21 and 3p25 [25], and also in regions 5p15.3 and

11q22.3 [24]. However, the relative importance of these genetic events in MB pathogenesis remains poorly understood.

The cytogenetic analysis from the biopsy specimens of MB shows often the presence of normal or partially analyzable karyotypes [3, 5, 7, 16, 20, 28, 29]. In this prospect, the development of MB cell lines, a reliable source of *in vitro*-grown cells, and the use of molecular cytogenetics approaches, both provide powerful tools to study chromosomal aberrations in MB. To date, only about twenty derivated PNETs cell lines, such as D283 MED, D341 MED, D384 MED, D425 MED, D458 MED, DAOY, ONS-76, ONS-81, MHH-MED 1-4, MCD-1, CHP707m and Dev, were established and characterized [30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42]. However, relatively few published karyotypes on these cell lines are available and, to our knowledge, none were characterized by molecular cytogenetic techniques.

The chromosomal analysis of UM-MB1 cell line that we have previously established was only evaluated by classical cytogenetics [43]. In the present study, we used a modified comparative genomic hybridization (mCGH) technique in order to determine a more detailed chromosomal profile of the UM-MB1 cell line. Indeed, this technique enables to identify and map over-represented regions of chromosomes in the whole genome, which could otherwise be undetectable by conventional cytogenetic [44, 45, 46]. Multiple whole chromosome paintings by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was

also performed in combination with mCGH to identify the complete and partial chromosome gains and losses involved in the UM-MB1 cell line, and to assess their possible importance in the pathogenesis of the MB.

MATERIAL AND METHODS

Cell Line and Cultures

The UM-MB1 cell line was derived from sterile sectioned MB tumor showing neuronal phenotype and excised by craniotomy from the posterior fossa of a 4-year-old female patient [43]. The cells were placed in culture flasks (Falcon, Becton and Dickinson, Mississauga, Canada) and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco Laboratories, Burlington, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma) at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. In general, media were replenished (by half feeds) one to two times weekly and cells were subcultured by trypsinization (0.125% trypsin for 5 minutes; Sigma). The absence of mycoplasmas was verified by Roche Molecular Biochemicals detection kit (Roche Diagnostics, Boehringer Mannheim, Canada).

Cytogenetic Analysis

Cultures in exponential growth were arrested in metaphase with 0.05 μ g/mL Colcemid (Canadian Life Technologies) for 4 hours before harvesting and treated with a 0.075M KCL solution for 1h at 37°C according to our usual procedure [47]. The cytogenetic analysis of UM-MB1 cell line was first done by studying karyotypes in GTG-banding [48]. The cells used for this analysis were from passages 10, 23, 53, 107 and 139, a minimum of 30 mitoses were counted for each passage. Chromosomal analyses were performed according to the International System Cytogenetic Nomenclature (1995) [49].

Molecular Cytogenetic Analysis

To identify aberrant chromosomal material of unknown origin, FISH experiments with whole chromosome paints were performed on slides from the same culture at passage 53. Chromosome-specific library DNAs from all chromosomes were hybridized on metaphase spreads according to the supplier's instructions (Oncor, Gaithersburg, MD, USA), except for chromosomes 15 (Roche Diagnostics, Boehringer Mannheim, Canada), X (AL Technologies, Arlington, VA, USA) and Y (VYSIS, Downers Grove, USA). Thus, the identification of altered chromosomes can be achieved by comparing chromosome banding and painting. In addition, the following specific probes for

MYC (8q24), *N-MYC* (2p24) and *TP53* (17p13.1) genes (Oncor, Gaithersburg, MD, USA) were hybridized according to Lemieux et al. [47].

A modified CGH technique (mCGH) [50] was also used to search for specific over-representations of chromosomal materials in the UM-MB1 cell line genome. Since the FISH techniques necessitate quality metaphase preparations, the passage 53 was chosen for the molecular cytogenetic analysis. Briefly, the mCGH approach consists in the co-hybridization of biotin-labeled tumoral DNA (60 ng) and unlabeled normal genomic DNA (60 ng) to normal metaphase chromosomes in presence of Cot-1 DNA (5 μ g) [50]. Thus, only UM-MB1 cell DNA was detected by anti-biotin and FITC (fluorescein isothiocyanate) conjugated antibodies, the chromosomes being counterstained with propidium iodide (PI) and mounted in a solution of antifade p-phenylenediamine (PPD), at pH 11, which induced R-banding [51]. The analysis was performed on 50 analyzable metaphase spreads by a conventional fluorescence microscope equipped with a double band pass filter and independently evaluated by a second observer with MacProbe logiciel. Gains of DNA sequences or over-represented regions were considered high when at least 50% of the observed metaphases showed a signal on both chromatids of at least one homologue.

RESULTS

Chromosomal analysis carried out on UM-MB1 cells at passages 10, 23, 53, 107 and 139 showed various cell populations with nearly identical chromosomal abnormalities throughout all passages. No double minute chromosomes or homogeneously staining region was observed. Chromosome numbers ranged from 60 to 102. The previously published chromosomal formula of UM-MB1 cell line [43] was then reassessed after the use of chromosome painting, and a near-tetraploid mainline and stemline karyotype with approximately 75 chromosomes (representing at least 50% of the metaphases) was established:

75<4n>,XX,-X,-X,+der(2)t(2;3)(q34;p13),-2,-2,+der(3)t(2;3)(q34;p13)x2,-3,-3,-4,+der(5)t(5;19)(p15?;q13.3)x2,-5,-5,+i(8)(q10),-8,+i(9)(q10)x2,-9,-9,-9,-9,+der(10)t(10;17)(q24~26;q21?),-10,-10,+der(11)t(7;11)(q11.2;q13)x2,+der(11)del(11)(p13?)x2,-11,-11,-11,-11,-12,-12,-13,-14,-14,-15,+der(16)t(16;17)(q11.2;q21)x2,-16,-16,-17,-17,+der(19)t(12;19)(q22?;q13.3)x2,-19,-19,-19,-19,-21,-21,+der(22)t(12;15;22)(q13q22;q15;q11.2)x2,+der(22)t(12;22)(q22?;p11.1)x2,+idic(22)(q11.1)x2,-22,-22,-22,-22.

A representative G-banded karyotype of the UM-MB1 cells with a summary of the rearrangements specified by chromosome painting is illustrated in Figure 1.

The karyotype and FISH analysis of the UM-MB1 cells led to several recurrent numerical and structural imbalances estimated in relation to the tetraploid level, which is more convenient and biologically meaningful for this cell line (Figure 1) [49]. About 30% of chromosomes are rearranged in the UM-MB1 cell line. In the light of the FISH results and the chromosome banding analysis, detailed regions of partial and complete clonal chromosome gains and losses were identified, as illustrated in Figures 1 and 2, and summarized in Table 1. On one hand, chromosomal gains included the 7(q11.2→qter) (6 copies), 8q arm (5 copies), 12(q22→qter) (6 copies), 15(q15→qter) (5 copies), 17(q21→qter) (5 copies), and two specific regions of chromosome 22: pter→q11.2 (8 copies) and q11.2→qter (6 copies). On the other hand, clonal chromosomal losses involved one copy of chromosomes 4, 10, and 13, and two copies of chromosomes X, 14, 19 and 21. Moreover, recurrent losses resulted in structural rearrangements concerning the chromosomal segments: 2(pter→q34), 3(pter→p13), 5(pter→p15), 8p, 9p, 10(q24~26→qter), 11(pter→p13), 11(q13→qter), 12(pter→q13), 15(pter→q15), 16(q11.2→qter) and 17(pter→q21) (Table 1).

The mCGH analysis, such as previously reported by Muleris et al. [45], showed two types of signals, one corresponding to whole chromosome arms, and the others to limited segments. The over-represented chromosomal regions involved mainly: a) the chromosomal segments: 2(p22→q24) (22%), 2(q34→q36) (26%), 5(pter→p15) (6%), 5(q32→qter) (8%) and 13(q12→q14) (16%); b) the

partial chromosome arms: 7(q11.2→qter) (60%), 9(q21→qter) (18%), 12q22-qter (28%) and 17(q21→qter) (28%); and c) the chromosome arms: 8q (38%), 15q (80%) and 22q (60%). These results are depicted in Figures 3 and 4 and summarized in Table 1.

Finally, the detection of both oncogenes *c-myc* (10 signals) and *N-myc* (6 signals), localized respectively on 8q24 and on 2p24, and of *TP53* gene (4 signals) localized on chromosome band 17p13.1, was also revealed by FISH analysis (results not show).

DISCUSSION

The identification of tumor-related chromosomal abnormalities, such as amplifications, deletions and translocations, is the first step for the genetic characterization of tumors. The establishment of cancer cell lines provides an endless source of genomic material and a valuable model for the study of genetic changes involved in the pathogenesis of tumors. Concerning PNET/MB tumors, although several cell lines were previously described and used, to our knowledge, their chromosomal imbalances have only been analyzed by conventional cytogenetics [2, 30, 31, 33, 34, 38, 39, 40, 42].

In the present study, karyotype, FISH and mCGH analyses were used to determine in detail the chromosomal profile of the UM-MB1 cell line. The

karyotypic analysis of UM-MB1 showed a population of near-tetraploid cells with 75 chromosomes and numerous clonal aberrations. Previous studies showed, however, that a number of PNET/MB cell lines, such as D283 Med, D341 Med, CHP707m and MHH-MED-1 to -4, demonstrated stemline karyotypes with near-diploid chromosomes counts [31, 33, 38, 40]. Only DAOY cell line was near-tetraploid [34]. Similarly, diploid or near-diploid stemlines were also reported on the majority of PNET/MB tumors [5, 7, 15, 21, 29, 52]. Many childhood tumors show prognostic values according to their DNA ploidy status. However, in MB, the data regarding the association between DNA ploidy and clinical outcome are still not conclusive [53, 54, 55].

The UM-MB1 cell line revealed by FISH 10 signals of the oncogene *c-myc* and 6 of *N-myc*. This is consistent with the karyotype analysis. Consequently, the presence of these oncogenes in additional copies was not involved in a high-level gene amplification. Fuller and Bigner [56] reported that about only 10% of MB tumors show amplification of *MYC*, *N-MYC* and *EGFR* (7p12) proto-oncogenes and to date, only one CGH study on PNET/MB tumors has detected amplification of these reported locus: 2p24 (6% of tumors) and 8q24 (17%) [23]. However, the *c-myc* amplification was observed in a high proportion of MB cell lines which suggests that subclones of cells with this gene amplification have a selective growth advantage *in vitro* [26, 39, 40, 56]. Amplifications as double minute chromosomes (DMs) were not seen in UM-MB1 cell line. Nevertheless, DMs are observed in approximately 10-20 % of

MBs; these cases generally contain also amplification of *c-myc* or, less often, of *N-myc* [2, 39, 56]. Furthermore, previous data demonstrated that amplification of *c-myc* in medulloblastoma is associated with a worse prognosis [13, 57], whereas *N-myc* expression is related to primitiveness of MB cells [58, 59]. Thus, the amplification of these oncogenes may be a prognostic indicator in some patients with MB.

After chromosome painting we were able to identify precisely chromosome segments involved in structural rearrangements that were previously undetectable by conventional cytogenetic approaches [43]. Furthermore, the mCGH technique allowed the identification of some over-represented chromosomal regions, also revealed by FISH, but that were unsuspected by chromosomal banding analyses. Indeed, by mCGH, we observed intense recurrent signals on the chromosome regions 12(q22→qter) and 17(q21→qter) (28 % of metaphases, each). Nevertheless, in general the correlation between mCGH and cytogenetic findings was good; the majority of the excess chromosomal segments, as detected by mCGH, were also reported by cytogenetic/FISH analyses (see Table 1). We also observed six new over-represented regions that were not detected by cytogenetic/FISH: 2(p22→p24), 2(q34→q36), 5(p15→pter), 5(q32→qter), 9(q22→qter) and 13(q12→q14). These gains were expressed in a relatively low percentage (ranging from 6% to 26%). This discrepancy between mCGH and karyotype/FISH data might result from the fact that mCGH identifies over-represented regions of the total tumoral ADN

that is extracted from all the UM-MB1 cells at passage 53, whereas karyotype/FISH analysis reveals chromosomal abnormalities within one cellular population [50]. It is then possible that a smaller cellular sub-population shows a clonal evolution where certain recurrent abnormalities could appear.

The mCGH analysis carried out on UM-MB1 cell line revealed three frequently over-represented chromosomal regions: 7q11.2→qter, 15q and 22q present respectively in 60%, 80% and 60% of the examined metaphases. Interestingly, the chromosome 22q accounted for the most common exceeding genomic material as demonstrated by Karyotypic/FISH analysis. The involvement of chromosome 15 in PNET/MB tumors has not been reported previously and the cytogenetic aberration documented on chromosome 22 was rather a monosomy, found in less than 30% of PNET/MB cases [3, 52]. Furthermore, it seems that the loss of chromosome 22 is very common in brain tumors [29] as well as in malignant rhabdoid tumors or atypical teratoid/rhabdoid tumors [60]. Thus, the important gains observed on the long arms of chromosomes 15 and 22 could represent novel regions that contribute specifically to the pathogenesis of UM-MB1. They could, however, play a role in other PNETs/MBs. Additional studies on MBs are thus needed in order to give more insight on the importance of these gains.

The recurrent gain of the chromosome 7q11.2→qter in the UM-MB1 cell line is in agreement with previous CGH data showing that one third of the PNET/MB tumor samples result in gains of the chromosome 7q [23, 24, 25, 26,

27]. Moreover, it was reported that trisomy 7 is the most common secondary change in PNET/MB and is often seen with an i(17q) [14, 15]. The excess copies of chromosome 7 are also commonly noted in other brain tumors [61, 62], as well as in nonneoplastic tissues [62, 63], suggesting then an uncertain role of this chromosome in the oncogenetic events of MB.

The analysis of mCGH exhibited an over-representation of the chromosome 8q in 38% of metaphases. The gain of the long arm of chromosome 8 with the reciprocal loss of chromosome 8p, resulting in the formation of an i(8q), was also observed in 2 MBs studied by Reardon et al. [24]. Interestingly, they revealed association between genomic losses of both chromosomes 8p and 16q, which is in agreement with our results. Thus, this event may play a complementary role in the pathogenesis of MB.

In our analysis we also noted frequent gains of the 12q22→qter region (28%), as previously reported in CGH studies on PNET/MB tumors [24, 26]. Furthermore, Nicholson et al. [26] suggested a potential role of Eps8 (epidermal growth factor receptor pathway substrate 8) gene, mapped at the chromosomal band 12q23-q24, in the development or progression of PNETs/MBs. Nevertheless, additional study will be needed to clarify the relative importance of such gains in these tumors.

The earlier cytogenetic analyses of PNETs/MBs established that the most common recurring abnormality is an isochromosome 17q. It is believed that change was probably involved in the etiology or progression of these tumors.

The loss of chromosome 17p with the reciprocal gain of 17q, which suggest the formation of the i(17q), was reported through CGH analysis in 23% of the PNET/MB cases [23, 24, 25, 26]. Our chromosomal analysis of the UM-MB1 cell line did not reveal the i(17q). We found, however, the loss of the 17qter→p21 region (2 copies) and the gain of the 17q21→qter region (5 copies and 28% of metaphases by mCGH). The gain of 17q was reported in about 40% of PNETs/MBs [23, 24, 25, 26, 27]. However, this relative importance, contrarily to the 17p event, remains uncertain and poorly exploited. The duplicated 17q portion in tumors with an i(17q) may imply the *HER2/neu/ERBB2* oncogene mapped on 17q11.2-q12, and the *c-erbB-2* oncogene product was reported to be expressed in the majority of MBs [14, 64]. Our results show that this chromosomal portion was not frequently over-represented. It involved rather the 17qter→q21 region. Interestingly, Meddeb and colleague detected additional material from 17q23.1-qter in more than 90% of high-grade neuroblastomas [65]. Furthermore, the amplification of area 17q22-q23 was found in one case of meningioma and in breast cancers, involving probably a critical region of candidate oncogenes [66].

The absence of the short arms of chromosome 9 constitutes the major loss in UM-MB1 cell line. The involvement of chromosome 9p is very rare in medulloblastoma; only 4 studied cases illustrated anomalies in their short arms [6, 16, 52]. Nevertheless, the lack of genomic material on 9p is associated with loss of interferon (IFN) gene clusters, mapped to 9p22, and it is suggested that

this specific change plays an important role in the tumorigenesis of malignant gliomas. [67].

The chromosomal banding and FISH analysis on UM-MB1 cell line illustrated a terminal loss of the chromosome 10q, at region 10q24~26→qter, which is in agreement with previous CGH [23, 24, 25, 26, 27] and LOH [13, 22] studies on PNET/MB tumors. Moreover, structural rearrangements implicating the same region were observed in MHH-MED-1 and MHH-MED-2 cell lines [40]. Thus, these results portray the importance of the terminal portion of chromosome 10q and suggest the presence of one or numerous tumor suppressor loci. Interestingly, a novel putative tumor-suppressor gene, *DMBT1* (deleted in malignant brain tumors), on chromosome 10q25.3-q26.1, has been implicated in the pathogenesis of medulloblastoma and glioblastoma multiforme [68].

The numerical and structural anomalies involving chromosomal short and long arms of chromosome 11 were frequently reported in PNETs/MBs. Moreover, LOH on 11p, less frequently of the 17p, can also be detected in MB [69]. In this report, two missing regions were reported on chromosome 11, at 11pter→p13 and 11q13→qter. Similarly, the cytogenetic analysis of the MHH-MED-2 cell line showed structural aberration of the 11q24 region [40]. However, in pineoblastoma, an interstitial deletion within band 11q13 was implicated in the development of these tumors [14, 70].

Finally, the recurrent loss of sex chromosomes was revealed in both PNETs/MBs tumors and cell lines [3, 24, 25, 26, 27, 34]. With respect to UM-MB1 cell line, 2 clonal copies of chromosome X were lacking. It seems,

however, that the loss of chromosome X is not specific to PNETs/MBs since it can occur as well in normal brain tissue [71]. It is also known that in elderly women the presence of cells with a chromosomal constitution at 45, X is significantly increased [72]. Therefore, the alteration observed on chromosome X, like trisomy 7, seems to be a property of normal, not tumor, tissue [14, 71].

In conclusion, the present study shows that UM-MB1 cell line is cytogenetically representative of the PNET/MB tumors *in vivo* and that it may be helpful for further understanding the biology of these tumors. Indeed, this study reports many of the previous cytogenetic data, but also two novel chromosomal regions of interest, on 15q and 22q, that could be implicated in the tumorigenic process of some PNETs/MBs. However, other cases have to be genetically analyzed to know more precisely the genetic events underlying the pathology of this tumor.

Figure 1 Representative GTG-banded karyotype of UM-MB1 cell line. Numbers on the right and left sides of rearranged chromosomes indicate the chromosomal origin as confirmed by chromosome painting.

Figure 2 Tumor metaphases after FISH using different probes, detected via FITC and counterstained by PI. **A)** Chromosome painting 2; **B)** Chromosome painting 12; **C)** Chromosome painting 15; **D)** Chromosome painting 16, **E)** Chromosome painting 17; **F)** Chromosome painting 22.

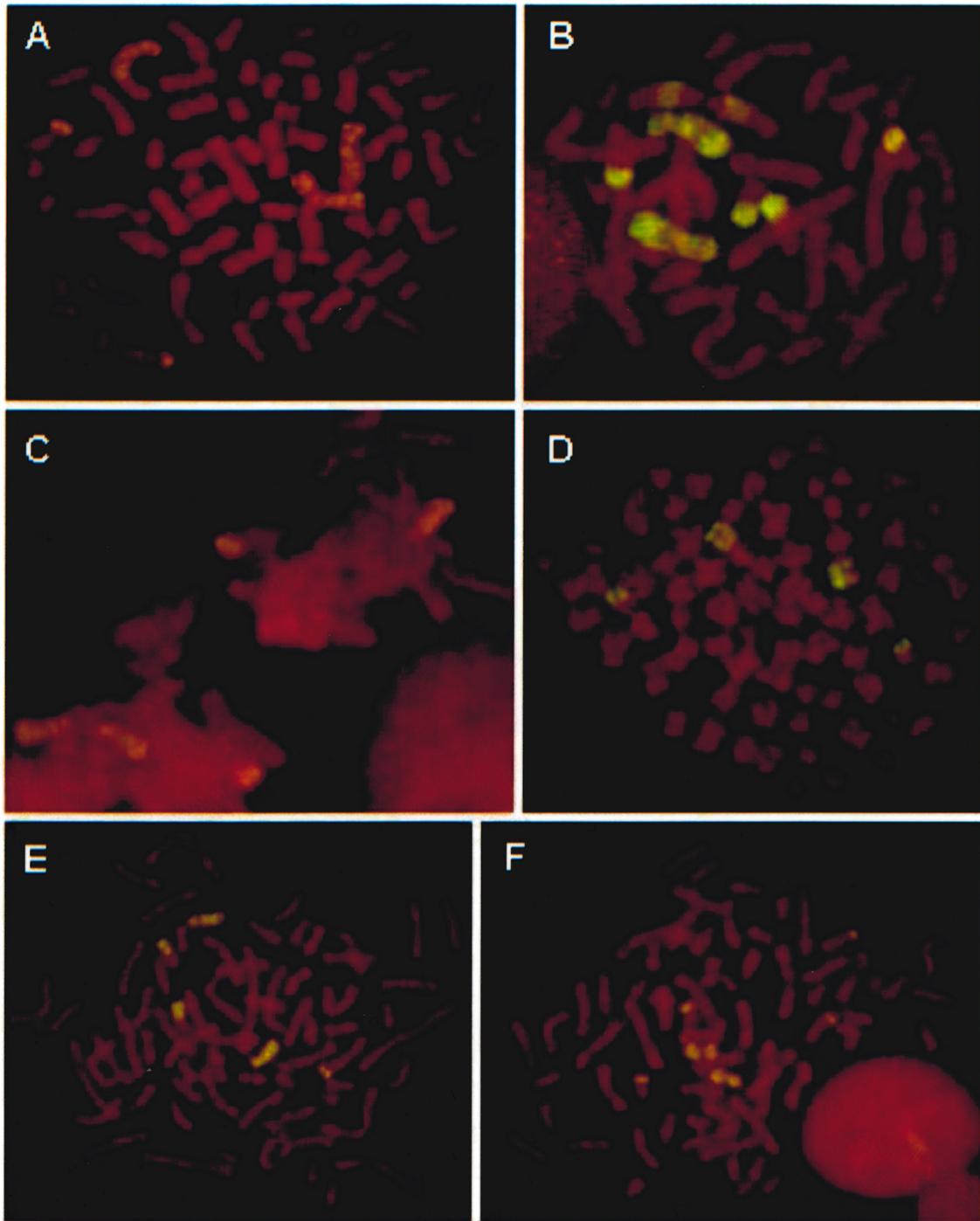


Figure 2

Figure 3 A) Normal human metaphase spread after mCGH, using DNA from UM-MB1 cell line. Yellow signals indicate over-represented DNA segments in the tumor genome. Signals show amplification on chromosomes 2, 7, 8, 12, 13, 15, 17 and 22. B) R-banded chromosomes of the same metaphase counterstained with PI.

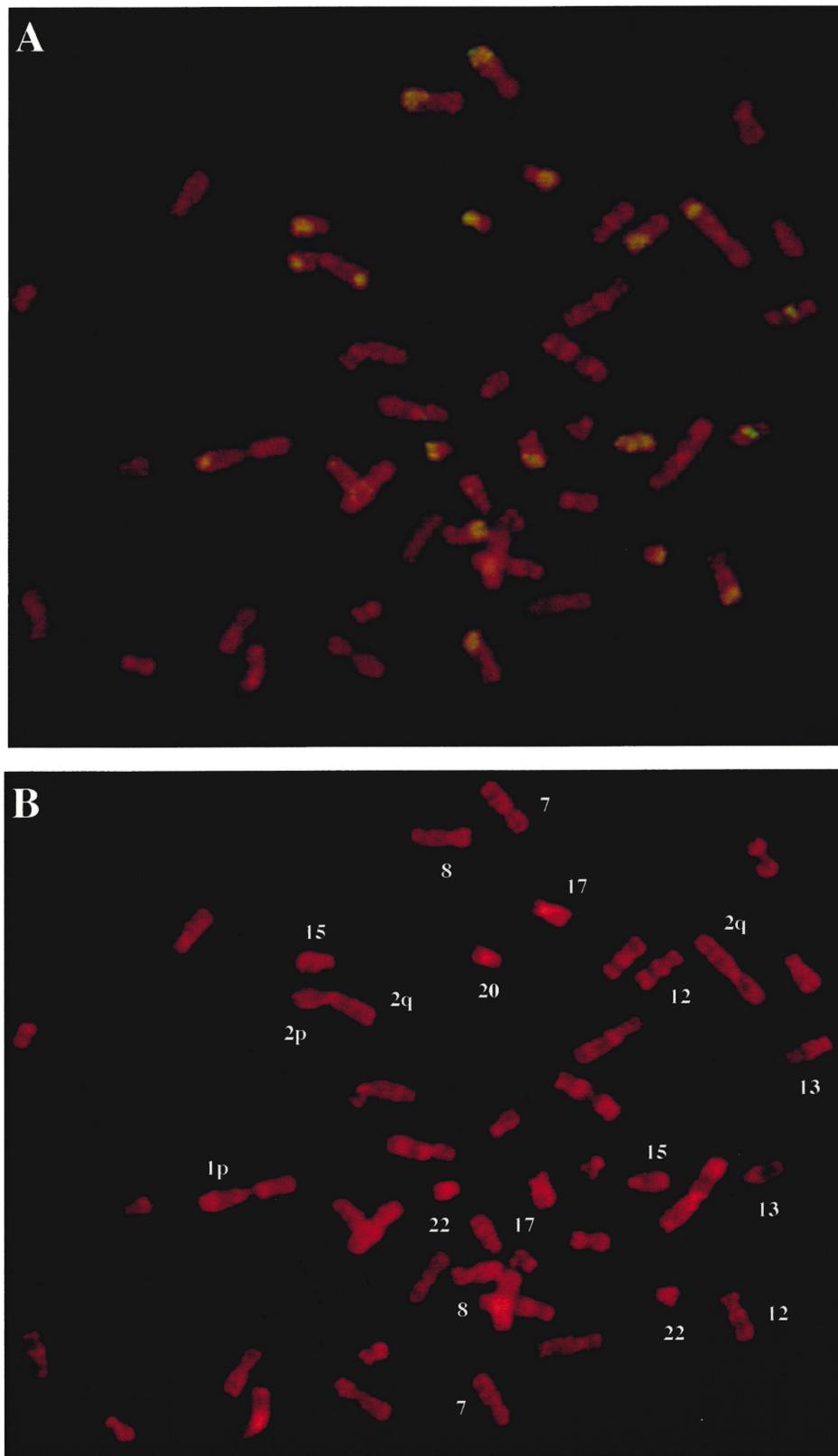


Figure 3

Figure 4 R-banded ideogram showing chromosomal localization of increased DNA-sequence observed by mCGH in UM-MB1 cell line. Each vertical line represents 1 signal and each bold line represents 5 signals.

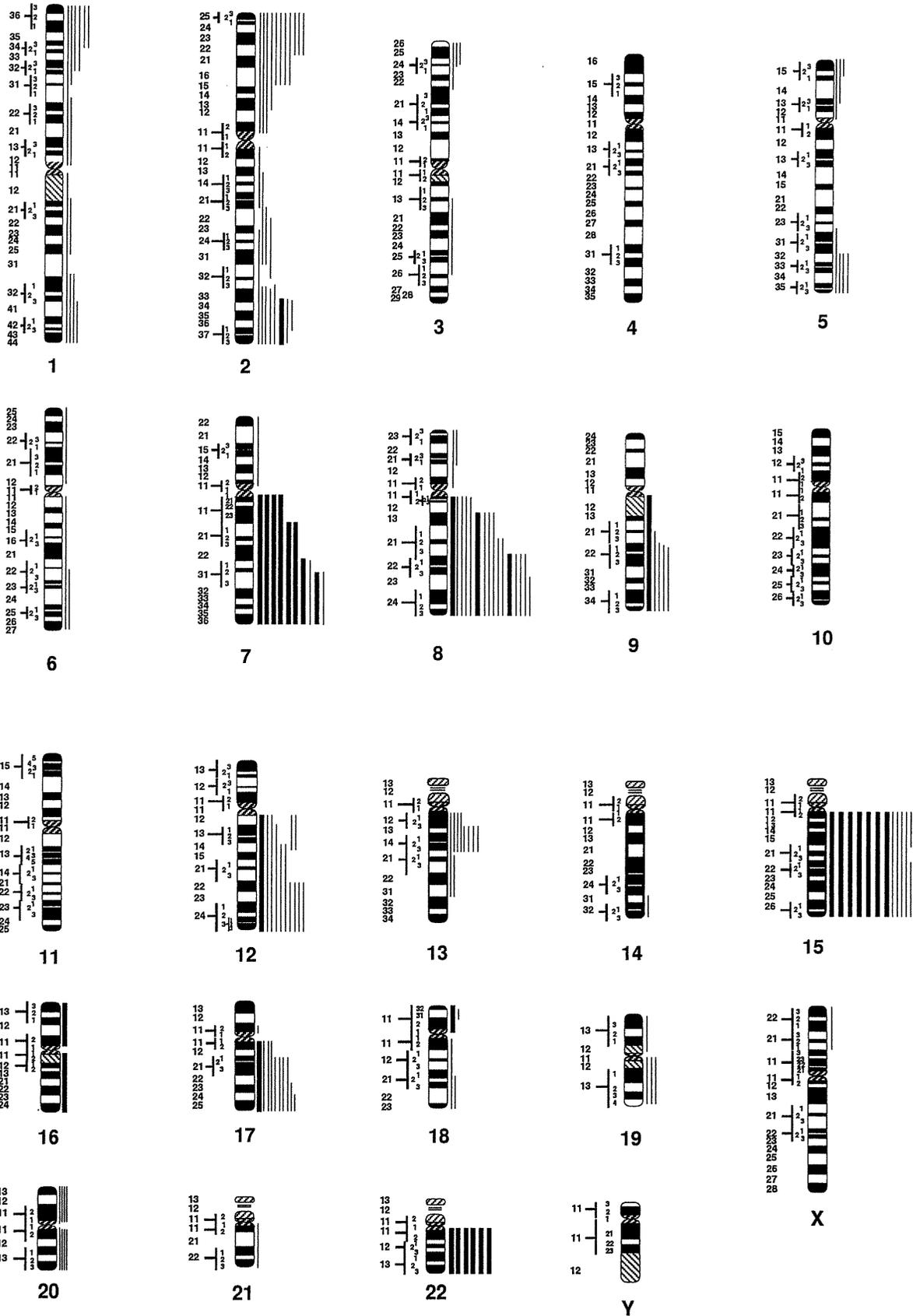


FIGURE 4

Tabular Material**Table 1** Comparison of Cytogenetics, FISH and mCGH Results in UM-MB1 Cell Line

Cytogenetics and FISH			mCGH
Structural abnormalities	Gains*	Losses*	Gains (% of metaphases)
der(2)t(2;3)(q34;p13)		2pter→q34	2p22→p24 (22%)
der(3)t(2;3)(q34;p13)x2		3pter→p13	2q34→q36 (26%)
		4	
der(5)t(5;19)(p15;q13.3)x2		5pter→p15 (2x)	5pter→p15 (6%)
der(19)t(12;19)(q22;q13.3)x2		19 (2x)	5q32→qter (8%)
i(8)(q10)	8q (5x)	8p	8q (38%)
i(9)(q10)x2		9p (4x)	9q21→qter (18%)
der(10)t(10;17)(q24~26;q21?)		10q24~26→qter 10	
der(16)t(16;17)(p11.2;q21)x2	17q21→qter (5x)	16q11.2→qter (2x) 17pter→q21 (2x)	17q21→qter (28%)
der(11)t(7;11)(q11.2;q13)x2	7q11.2→qter (6x)	11q13→qter (2x)	7q11.2→qter (60%)
der(11)del(11)(p13?)x2		11pter→p13 (2x)	
		13	13q12→q14 (16%)
		14 (2x)	
		21 (2x)	
der(22)t(12;15;22)	12q22→qter (6x)	12pter→q13 (2x)	12q22→qter (28%)
(q13q22;q15;q11.2)x2	15q15→qter (5x)	15pter→q15	15q (80%)
der(19)t(12;19)(q22;q13.3)x2	22pter→q11.2 (8x)		22q (60%)
der(22)t(12;22)(q22;p11.1)x2	22q11.2→qter (6x)		
idic(22)(q11.1)x2			
		X (2x)	

* Number in () represent the gains or losses of partial or complete chromosomal copies.

Acknowledgments

The authors acknowledge the support provided by Le Téléthon des Étoiles sur les Maladies Infantiles (F.Léveillé) and the Research Center of Ste-Justine's Hospital. We also thank Dre Claude-Lise Richer for reading this manuscript and Mme. Fléchère Fortin for her skilled technical assistance.

REFERENCES

1. Nupponen NN, Hyytinen ER, Kallioniemi AH, Visakorpi T (1998): Genetic alterations in prostate cancer cell lines detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 101: 53-57.
2. Bigner SH, Mark J, Friedman HS, Biegel JA, and Bigner DD (1988): Structural chromosomal abnormalities in human medulloblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 30: 91-101.
3. Biegel JA, Rorke LB, Packer RJ, Sutton LN, Schut L, Bonner K, Emanuel BS (1989): Isochromosome 17q in primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Genes Chromosom Cancer* 1: 139-147.
4. Biegel JA, Rorke LB, Janss AJ, Sutton LN, Parmiter AH (1995): Isochromosome 17q demonstrated by interphase fluorescence in situ hybridization in primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Genes Chromosom Cancer* 14: 85-96.
5. Karnes PS, Tran TN, Cui MY, Raffel C, Gilles FH, Barranger JA, and Ying KL (1992): Cytogenetic analysis of 39 pediatric central nervous system tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 59: 12-19.
6. Vagner-Capodano AM, Zattara-Cannoni H, Gambarelli D, Gentet JC, Genitori L, Lena G, Graziani N, Raybaud C, Choux M, and Grisoli F (1994): Detection of i(17q) chromosome by fluorescence in situ hybridization (FISH) with interphase nuclei in medulloblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 78: 1-6.
7. Fujii Y, Hongo T, and Hayashi Y (1994): Chromosome analysis of brain tumors in childhood. *Genes Chromosom Cancer* 11: 205-215.
8. Giordana MT, Migheli A, and Pavanelli E (1998): Isochromosome 17q is a constant finding in medulloblastoma. An interphase cytogenetic study on tissue sections. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24: 233-238.
9. Cogen PH, Daneshvar L, Metzger AK, Duyk G, Edwards MSB, Sheffield VC (1992): Involvement of multiple chromosome 17p loci in medulloblastoma tumorigenesis. *Am J Hum Genet* 50: 584-589.
10. Albrecht S, von Deimling A, Pietsch T, Giangaspero F, Brandner S, Kleihues P, and Wiestler OD (1994): Microsatellite analysis of loss of heterozygosity on chromosome 9q, 11p and 17p in medulloblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20: 74-81.
11. McDonald JD, Daneshvar L, Willert JR, Matsumura K, Waldman F, and Cogen PH (1994): Physical mapping of chromosome 17p13.3 in the region of

- a putative tumor suppressor gene important in medulloblastoma. *Genomics* 23: 229-232.
12. Scheurlen WG, Krauss J, Kühl J (1995): No preferential loss of one parental allele of chromosome 17p13.3 in childhood medulloblastoma. *Int J Cancer* 63: 372-374.
 13. Scheurlen WG, Schwabe GC, Joos S, Mollenhauer J, Sörensen N, Kühl J (1998): Molecular analysis of childhood primitive neuroectodermal tumors defines markers associated with poor outcome. *J Clin Oncol* 16: 2478-2485.
 14. Biegel JA (1997): Genetics of pediatric central nervous system tumors. *J Pediatr Hematol Oncol* 19: 492-501.
 15. Bigner SH, Mark J, Bigner DD (1990a): Cytogenetics of human brain tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 47: 141-154.
 16. Griffin CA, Hawkins AL, Packer RJ, Rorke LB, and Emanuel BS (1988): Chromosome abnormalities in pediatric brain tumors. *Cancer Res* 48: 175-180.
 17. Raffel C, Gilles FE, Weinberg KI (1990): Reduction to homozygosity and genes amplification in central nervous system primitive neuroectodermal tumors of childhood. *Cancer Res* 50: 587-591.
 18. James DC, He L, Carlom E, Mikkelsen T, Ridderheim P-A, Cavenee WK, Collins VP (1990): Loss of genetic information in central nervous system tumors common to children and young adults. *Genes Chromosom Cancer* 2: 94-102.
 19. Thomas GA, Raffel C (1991): Loss of heterozygosity on 6q, 16, 17p in human central nervous system primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 51: 639-643.
 20. Neumann E, Kalousek DK, Norman MG, Steinbok P, Cochrane D, Goddard K (1993): Cytogenetic analysis of 109 pediatric central nervous system tumors. *Cancer Cytogenet* 71: 40-49.
 21. Sainati L, Bolcato S, Montaldi A, Celli P, Stella M, Leszl A, Silvestro L, Perilongo G, Cordero di Montezemolo L, Basso G (1996): Cytogenetics of pediatric central nervous system tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 91: 13-27.
 22. Blaeker H, Ahmed Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Batra SK, Fuchs HE, and Bigner SH (1996): Microsatellite analysis of childhood brain tumors. *Genes Chromosom Cancer* 15: 54-63.

23. Schütz BR, Scheurlen W, Krauss J, du Manoir S, Joos S, Bentz M, Lichter P (1996): Mapping of chromosomal gains and losses in primitive neuroectodermal tumors by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 16: 196-203.
24. Reardon DA, Michalkiewicz E, Boyett JM, Sublett JE, Entrekin RE, Ragsdale ST, Valentine MB, Behm FG, Li H, Heideman RL, Kun LE, Shapiro DN, Look AT (1997): Extensive genomic abnormalities in childhood medulloblastoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 57: 4042-4047.
25. Avet-Loiseau H, Vénuat A-M, Terrier-Lacombe M-J, Lellouch-Tubiana A, Zerah M, Vassal G (1999): Comparative genomic hybridization detects many recurrent imbalances in central nervous system primitive neuroectodermal tumors in children. *Br J Cancer* 79: 1843-1847.
26. Nicholson JC, Ross FM, Ellison DW (1999): Comparative genomic hybridization and histological variation in primitive neuroectodermal tumours. *Br J Cancer* 80: 1322-1331.
27. Russo C, Pellarin M, Tingby O, Bollen AW, Lamborn KR, Mohapatra G, Collins VP, Feuerstein BG (1999): Comparative genomic hybridization in patients with supratentorial and infratentorial tumors. *Am Cancer Soc* 86: 331-339.
28. Sawyer JR, Swanson CM, Roloson GJ, Longee DC, Boop FA, Chadduck WM (1991): Molecular cytogenetic analysis of a medulloblastoma with isochromosome 17 and double minutes. *Cancer Genet Cytogenet* 57: 181-186.
29. Agamanolis DP, Malone JM (1995): Chromosomal abnormalities in 47 pediatric brain tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 81: 125-134.
30. Friedman HS, Bigner SH, McComb RD, Schold SC, Pasternak JF, Groothuis DR, Bigner DD (1983): A model for human medulloblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 42: 485-503.
31. Friedman HS, Burger PC, Bigner SH, Trojanowski JQ, Wikstrand CJ, Halperin EC, Bigner D.D (1985): Establishment and characterization of the human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft D283 Med. *J Neuropathol Exp Neurol* 44: 592-605.
32. Trojanowski JQ, Friedman HS, Burger PC, Bigner DD (1987): A rapidly dividing human medulloblastoma cell line (D283 MED) expresses all three neurofilament subunits. *Am J Pathol* 126: 358-363.

33. Friedman HS, Burger PC, Bigner SH, Trojanowski JQ, Brodeur GM, He X, Wikstrand CJ, Kurtzberg J, Berens ME, Halperin EC, Bigner D.D (1988): Phenotypic and genotypic analysis of a human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft D341 Med demonstrating amplification of *c-myc*. *Am J Pathol* 130: 472-484.
34. Jacobsen PF, Jenkyn DJ, Papadimitriou JM (1985): Establishment of a human medulloblastoma cell line and heterotransplantation into nude mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 44: 472-485.
35. He X, Skapek SX, Wikstrand CJ, Friedman HS, Trojanowski JQ, Kemshead JT, Coakham HB, Bigner SH (1989): Phenotypic analysis of four human medulloblastomas cell lines and transplantable xenografts. *J Neuropathol* 48: 48-68.
36. He X, Wikstrand CJ, Friedman HS, Bigner SH, Pleasure S, Trojanowski JQ, Bigner D.D (1991): Differentiation characteristics of newly established medulloblastoma cell line (D384 Med, D425 Med, and D458 Med) and their transplantable xenografts. *Lab Invest* 64: 833-843.
37. Tamura K, Shimizu K, Yamada M, Okamoto Y, Matsui YM, Park KC, Mabuchi E, Moriuchi S, Mogami H (1989): Expression of a major histocompatibility complex on human medulloblastoma cells with neuronal differentiation. *Cancer Res* 49: 5380-5384.
38. Baker DL, Reddy UR, Pleasure S, Hardy M, Williams M, Tartaglione M, Biegel JA, Emanuel BS, Lo Presti P, Kreider B, Trojanowski JQ, Evans A, Roy AR, Venkatakrisnan G, Chen J, Ross AH, Pleasure D (1990): Human central nervous system primitive neuroectodermal tumor expressing nerve growth factor receptors: CHP707m. *Ann Neurol* 28: 136-145.
39. Bigner SH, Friedman HS, Vogelstein B, Oakes J, Bigner DD (1990 b): Amplification of the *c-myc* gene in human medulloblastoma cell lines and xenografts. *Cancer Res* 50: 2347-2350.
40. Pietsch T, Scharmann T, Fonatsch C, Schmidt D, Öckler R, Freihoff D, Albrecht S, Wiestler OD, Zeltzer P, Riechm H (1994): Characterization of five new cell lines derived from human primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 54: 3278-3287.
41. Moore KD, Dillon-Carter O, Conejero C, Poltorak M, Chedid M, Tornatore C, Freed WJ (1996): In vitro properties of a newly established medulloblastoma cell line, MCD-1. *Mol Chem Neuropathol* 29: 107-126.

42. Derrington EA, Dufay N, Rudkin BB, Belin M-F(1998): Human primitive neuroectodermal tumour cells behave as multipotent neural precursors in response to FGF2. *Oncogene* 17: 1663-1672.
43. Kenigsberg RL, Hong Y, Yao H, Lemieux N, Michaud J, Tautu C, Theoret Y (1997): Effects of basic fibroblast growth factor on the differentiation, growth, and viability of a new human medulloblastoma cell line (UM-MB1). *Am J Pathol* 15: 867-881.
44. Muleris M, Almeida A, Dutrillaux AM, Pruchon E, Vega F, Delattre JY, Poisson M, Malfoy B, Dutrillaux B (1994 a): Oncogene amplification in human gliomas: a molecular cytogenetic analysis. *Oncogene* 9: 2717-2722.
45. Muleris M, Almeida A, Gerbault-Seureau M, Malfoy B, Dutrillaux B (1994 b): Detection of DNA amplification in 17 primary breast carcinomas with homogeneously staining regions by a modified comparative genomic hybridization technique. *Genes Chromosom Cancer* 10: 160-170.
46. Muleris M, Almeida A, Gerbault-Seureau M, Malfoy B, Dutrillaux B (1995): Identification of amplified DNA sequences in breast cancer and their organization within homogeneously staining regions. *Genes Chromosom Cancer* 14: 155-163.
47. Lemieux N, Richer C-L (1989): Synchronisation of cultured retinoblastoma cells for high resolution chromosomes showing up to 1000 bands. *Cancer Genet Cytogenet* 40: 55-63.
48. Seabright M (1971): A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* ii: 971-972.
49. ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. F Mitelman, ed. S. Karger, Basel.
50. Muleris M, Richard F, Apiou F, Dutrillaux B (1996): Hybridation *in situ* en cytogénétique moléculaire-principes et techniques- Tec & Doc Lavoisier and Edition Médicales Inter., France.
51. Lemieux N, Dutrillaux B, Viegas-Péquinot E (1992): A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence *in situ* hybridization of small single-copy genes. *Cytogenet Cell Genet* 59: 311-312.
52. Bhattacharjee MB, Amstrong DD, Vogel H, Cooley LD (1997): Cytogenetic analysis of 120 primary pediatric brain tumors and literature review. *Cancer Genet Cytogenet* 97: 39-53.

53. Gilbertson RJ, Jaros E, Perry RH, Kelly PJ, Lunec J, Pearson ADJ (1997): Mitotic percentage index: a new prognostic factor for childhood medulloblastoma. *Eur J Cancer* 33: 609-615.
54. Zerbini C, Gelber RD, Weinberg D, Sallan SE, Barnes P, Kupsky W, Scott M, Tarbell NJ (1993): Prognostic factors in medulloblastoma, including DNA ploidy. *J Clin Oncol* 11: 616-622.
55. Tait DM, Eeles RA, Carter R, Ashley S, Ormerod MG (1993): Ploidy and proliferative index in medulloblastoma: Useful prognostic factors? *Eur J Cancer* 29A: 1383-1387.
56. Fuller GN, Bigner SH (1992): Amplified cellular oncogenes in neoplasms of the human central nervous system. *Mutation Res* 276: 299-306.
57. Wasson JC, Saylor III RL, Zeltzer P, Friedman HS, Bigner SH, Burger PC, Bigner DD, Look AT, Douglass EC, Brodeur GM (1990): Oncogene amplification in pediatric brain tumors. *Cancer Res* 50(10): 2987-2990.
58. Moriuchi S, Shimizu K, Miyao Y, Hayakawa T (1996): An immunohistochemical analysis of medulloblastoma and PNET with emphasis on N-myc protein expression. *AntiCancer Res* 16: 2687-2692.
59. Moriuchi S, Shimizu K, Miyao Y, Kishima H, Okawa M, Hayakawa T (1997): Decreased N-myc expression in human medulloblastoma cell lines during differentiation. *Anticancer Res* 17: 301-306.
60. Rorke LB, Packer RJ, Biegel JA (1996): Central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors of infancy and childhood: definition of an entity. *J Neurosurg* 85: 56-65.
61. Schrock E, Blume C, Meffert M-C, du Manoir S, Bersch W, Kiessling M, Lozanowa T, Thiel G, Witkowski R, Ried T, Cremer T (1996): Recurrent gain of chromosome arm 7q in low-grade astrocytic tumors studied by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 15: 199-205.
62. Bardi G, Johansson B, Pandis N, Heim S, Mandahl N, Hagerstrand I, Holmin T, Andren-Sandberg A, Mitelman F (1992): Trisomy 7 in nonneoplastic focal steatosis of the liver. *Cancer Genet Cytogenet* 63: 22-24.
63. Johansson B, Heim S, Mandahl N, Mertens F, Mitelman F (1993): Trisomy 7 in nonneoplastic cells. *Genes Chromosom Cancer* 6: 199-205.
64. Gilbertson RJ, Pearson ADJ, Perry RH et al. (1995): Prognostic significance of the c-erbB-2 oncogene product in childhood medulloblastoma. *Br J Cancer* 73: 473-477.

65. Meddeb M, Danglot G, Chudoba I, Vénuat AM, Bénard J, Avet-Loiseau H, Vasseur B, Le Paslier D, Terrier-Lacombe MJ, Hartman O, Bernheim A (1996): Additional copies of a 25 Mb chromosomal region originating from 17q23.1-17qter are present in 90% of high-grade neuroblastomas. *Genes Chromosom Cancer* 17: 156-165.
66. Khan J, Parsa NZ, Harada T, Meltzer PS, Carter NP (1998): Detection of gains and losses in 18 meningiomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 103: 95-100.
67. López-Ginés C, Cerdá-Nicolás M, Gil-Benson R, Barcia-Salorio J.L, Llombart-Bosch A (1997): Involvement of the long arm of chromosome 9 in medulloblastoma in an adult. *Cancer Genet Cytogenet* 96: 81-84.
68. Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, von Diemling A, Poustka AM (1997): *DMBT1*, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat Genet* 17: 32-39.
69. Fults D, Petronio J, Noblett BD, Pedone CA (1992): Chromosome 11p15 deletions in human malignant astrocytomas and primitive neuroectodermal tumors. *Genomics* 14: 799-801.
70. Sreekantaiah C, Jockin H, Brecher ML et al. (1989): Interstitial deletion of chromosome 11q in a pineoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 39: 125-131.
71. Heim S, Mandhal N, Stromblad S, Lindstrom E, Salford LG, Mitelman G (1989): Trisomy 7 and sex chromosome loss in human brain tissue. *Cytogenet Cell Genet* 52: 136-138.
72. Therman E, Susman M (1993): *Human Chromosomes: Structure, Behavior, and Effects*. Third edition. Springer-Verlag, NY.

CHAPITRE 4
DISCUSSION GÉNÉRALE

4. DISCUSSION GÉNÉRALE

4.1 L'HYBRIDATION GÉNOMIQUE COMPARATIVE (CGH) ET MODIFIÉE (MCGH)

Avant de discuter de nos résultats proprement dits, nous allons parler de l'importance de l'utilisation de la technique d'hybridation génomique comparative de concert avec l'analyse caryotypique conventionnelle et la FISH.

4.1.1 Avantages

L'un des avantages majeurs de la méthode CGH est qu'elle permet, en une seule application, de détecter les régions chromosomiques excédentaires ou délétées dans un génome donné. Elle s'avère appropriée et très efficace pour l'analyse chromosomique des tumeurs solides, où les préparations chromosomiques de qualité sont difficiles à obtenir. Elle s'avère également très utile en cytogénétique clinique, pour l'identification de matériel génétique de nature inconnue, par exemple pour les patients porteurs de chromosomes marqueurs. De plus, en déterminant la localisation chromosomique des gènes amplifiés ou délétés, elle facilite leur identification ultérieure.

4.1.2 Validation

La concordance entre les résultats de l'hybridation génomique comparative et les données cytogénétiques est généralement très bonne, mais pas absolue (Muleris *et al.*, 1994a), et cela de façon prédominante dans les tumeurs avec un caryotype très complexe. En effet, certaines aberrations chromosomiques révélées par CGH ne sont pas mises en évidence par l'analyse cytogénétique conventionnelle, et inversement, certaines anomalies identifiées par l'analyse caryotypique ne sont pas détectées par CGH et cela à cause de la sensibilité différente de chacune des techniques.

4.1.3 Sensibilité de détection

La sensibilité de la technique CGH dépend à la fois de la taille du segment chromosomique affecté ainsi que du nombre de copies en excès ou perdues. Par conséquent, elle est très sensible pour révéler un gain de quelques copies d'une grande portion chromosomique, tel un chromosome entier ou un bras chromosomique; alors qu'une courte séquence d'ADN devra être augmentée en un grand nombre de fois pour être mise en évidence (Muleris *et al.*, 1996). En fait, on estime que la quantité d'ADN en excès (taille du segment affecté x taux d'amplification) doit être supérieure à 2 Mb pour être détectée par CGH (Piper *et al.*, 1995). De plus, la sensibilité de détection dépend également du niveau de ploïdie de la tumeur analysée. Par exemple, à l'aide de cette technique, il est plus

difficile de détecter la perte d'un chromosome dans une tumeur tétraploïde (3 copies au lieu de 4) que dans une tumeur diploïde (1 copie au lieu de 2).

4.1.4 Limites

Cette technique possède également certaines limites importantes à prendre en considération. D'abord, elle ne permet pas d'étudier l'hétérogénéité intratumorale. De plus, elle nécessite des prélèvements tumoraux non contaminés par les tissus normaux environnants qui sont susceptibles de minimiser les modifications. Si l'ADN des cellules normales représente plus de 50% de l'échantillon, la détection des aneuploïdies (section 1.2.1.3) devient alors difficile (Muleris *et al.*, 1996). En outre, les remaniements chromosomiques équilibrés, comme les translocations réciproques et les inversions ne sont pas détectables, seules les anomalies chromosomiques constituant des gains ou des pertes de matériel génétique le sont. Autre point important, de par l'ajout d'ADN Cot-1 (afin d'empêcher l'hybridation non spécifique des séquences répétées), les modifications quantitatives des régions juxtacentromériques et hétérochromatiques ne peuvent être évaluées par CGH. Et puis finalement, la diminution de l'intensité de fluorescence au niveau des extrémités des chromosomes rend plus difficile l'interprétation de tout changement de fluorescence dans les régions télomériques.

Bien que le CGH ainsi que la FISH soient des outils cytogénétiques très puissants, aucune de ces techniques ne peut remplacer l'analyse caryotypique conventionnelle comme méthode de détection du niveau d'altération des chromosomes dans les cellules tumorales (Heim et Mitelman, 1995).

4.2 IMPORTANCE DE LA CARACTÉRISATION DÉTAILLÉE DES LIGNÉES PNETs/MBs

Les changements génétiques sont impliqués dans les processus d'initiation et de progression des cancers. Dans le but d'identifier les gènes spécifiques qui y sont impliqués, les lignées cellulaires tumorales sont une source permanente et importante de matériel génétique pour le clonage de ces gènes. Dans cette visée, l'identification des anomalies chromosomiques (spécifiques et récurrentes) de ces lignées cellulaires constitue la première analyse. Cependant, comme nous l'avons mentionné déjà, l'analyse caryotypique classique des néoplasmes ne permet pas une évaluation cytogénétique complète, et ceci est causé en grande partie par la présence de remaniements complexes et de marqueurs chromosomiques difficilement identifiables. À notre connaissance, aucune analyse cytogénétique détaillée consolidant l'analyse du caryotype, de la FISH et du CGH, n'a été effectuée sur les lignées cellulaires PNETs/MBs présentement disponibles commercialement. Par conséquent, les déséquilibres génomiques cruciaux pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathogenèse du MB demeurent encore indéterminés.

4.3 LA LIGNÉE UM-MB1: UNE ANALYSE CYTOGÉNÉTIQUE COMBINÉE PAR CT, FISH ET MCGH

L'analyse caryotypique de la lignée UM-MB1, à partir de cinq passages différents (section 2.2), montre un clone principal de cellules para-tétraploïdes (± 92 ou $\pm 4n$) à 75 chromosomes comportant des anomalies (numériques et structurales) chromosomiques récurrentes (Figure 1, Chapitre 3). Par conséquent, UM-MB1 est une lignée cellulaire stable, même après plusieurs passages. Selon les données cytogénétiques rapportées et contrairement à notre lignée, la majorité des tumeurs PNETs/MBs possèdent des caryotypes diploïdes ($2n$) ou para-diploïdes ($\pm 2n$) (Bigner *et al.*, 1990a; Karnes *et al.*, 1992; Fujii *et al.*, 1994; Agamanolis *et al.*, 1995; Sainati *et al.*, 1996; Bigner *et al.*, 1990, 1997; Bhattacharjee *et al.*, 1997). Il en est de même pour la majorité des lignées cellulaires PNETs/MBs présentement caryotypées (Friedman *et al.*, 1985, 1988; Baker *et al.*, 1990; Pietsch *et al.*, 1994); seule la lignée DAOY montre des cellules para-tétraploïdes (Jacobsen *et al.*, 1985). En ce qui concerne l'étude de la relation entre le niveau de ploïdie des tumeurs MBs et le devenir clinique des patients, comme il a été signalé précédemment dans le Chapitre 1 (section 1.6.8, page), les conclusions rapportées sont très souvent contradictoires (Zerbini *et al.*, 1993; Tait *et al.*, 1993; Gilbertson *et al.*, 1997).

L'ensemble des déséquilibres chromosomiques de la lignée UM-MB1 est présenté au Tableau I du Chapitre 3. Grâce aux analyses cytogénétiques moléculaires par mCGH et par FISH, nous avons précisé la nature de certains

remaniements chromosomiques, restée jusqu'à lors indéterminée après l'analyse des caryotypes (Kenigsberg *et al.*, 1997). Par exemple, en ce qui concerne les chromosomes 12 et 17, ni l'étude du caryotype, ni l'analyse par FISH ne permettaient une identification des régions impliquées dans les remaniements touchant ces chromosomes (Figures 1 et 2, Chapitre 3). Toutefois, grâce au mCGH, il devient évident que ce sont les bras longs des chromosomes 12 et 17 qui sont impliqués, puisque des signaux des régions sur-représentées ont été détectés en 12q22→qter et 17q21→qter dans 28% des métaphases analysées (Figures 3 et 4, Chapitre 3).

La concordance entre les résultats du mCGH et les données caryotypiques est en générale très bonne. Toutefois, par l'analyse du mCGH six nouvelles régions chromosomiques sur-représentées sont mises en évidence, mais avec une incidence plus faible que les autres régions détectées. Deux régions sont localisées sur le chromosome 2, une en 2p22→p24 (22%) et l'autre en 2q34→q36 (26%), deux autres sur le chromosome 5, en 5pter→p15 (6%) et 5q32→qter (8%), une sur le bras long du chromosome 9, en 9q22→qter (18%), et une dernière région, localisée en 13q12→q14 (16%) (Figures 3 et 4, Chapitre 3). Tous les autres gains détectés par mCGH sont conformes aux gains identifiés par l'analyse chromosomique (Tableau I, Chapitre 3). La différence dans les résultats ci-haut mentionnés, peut s'expliquer par le fait que l'analyse chromosomique à partir de caryotypes révèle les anomalies chromosomiques présentes au sein d'une seule population cellulaire, le clone principal (le plus

représentatif). Par contre, l'analyse des régions sur-représentées par mCGH est effectuée à partir de l'ADN tumoral total extrait de l'ensemble des cellules de la lignée UM-MB1 au passage 53. Il est alors possible qu'une sous-population cellulaire plus petite montre une évolution clonale et que certaines anomalies récurrentes viennent s'y rajouter.

Puisque les pertes chromosomiques ne sont pas détectables par mCGH, l'identification des régions perdues ou délétées a été réalisée dans cette étude par l'analyse combinée du caryotype et des peintures chromosomiques (FISH). Nous avons observé dans la lignée UM-MB1 une perte clonale de plusieurs chromosomes entiers. En ce qui concerne le clone principal, les pertes touchent la presque totalité d'un chromosome 2 (les bras courts et la presque totalité des bras longs: la région 2q10→q34), une copie des chromosomes 4, 10 et 13 et deux copies des chromosomes X, 14, 19, et 21 (Figure 1, Tableau I, Chapitre 3). De plus, la perte de régions chromosomiques résultant de réarrangements structuraux récurrents, intéressant les portions chromosomiques 3pter→p13, 5pter→p15, 8p, 9p, 10q24~26→qter, 11pter→p13, 11q13-qter, 16q11.2-qter et 17pter→q21, (Figure 1, Tableau I, Chapitre 3) a également été retrouvée. Ces pertes d'une portion chromosomique, à l'exception des chromosomes 2, 3p et 5p, ainsi que des bras courts du chromosome 9, sont décrites dans la littérature comme étant non aléatoires (soit par l'analyse cytogénétique ou moléculaire) dans l'ensemble des tumeurs PNETs/MBs étudiées (Biegel *et al.*, 1989, 1995; Raffel *et al.*, 1990; James *et al.*, 1990; Thomas et Raffel, 1991; Fults *et al.*,

1992; Fujii *et al.*, 1994; Pietsch *et al.*, 1994; Blaeker *et al.*, 1996; Sainati *et al.*, 1996; Schütz *et al.*, 1996; Reardon *et al.*, 1997; Avet-Loiseau *et al.*, 1999; Russo *et al.*, 1999). L'analyse de ces régions chromosomiques d'intérêt sera plus longuement discutée dans la section qui suit.

4.4 PROFIL CYTOGÉNÉTIQUE DE LA LIGNÉE UM-MB1: UNE COMPARAISON AVEC LA LITTÉRATURE

Le profil chromosomique de la lignée UM-MB1 (Tableau I, Chapitre 3) sera comparé aux données cytogénétiques actuelles, publiées dans la littérature et obtenues à partir de cinq études par CGH (sur un total de 142 tumeurs fraîches), ainsi que de l'ensemble des tumeurs PNETs/MBs et des quelques lignées cellulaires caryotypées.

4.4.1 L'amplification génique dans le MB

Dans les cellules tumorales MBs, les amplifications géniques sont rarement observées. Par contre, lorsqu'elles le sont, elles apparaissent sous forme de DM. Fuller et Bigner (1992) ont rapporté qu'environ seulement 10% des tumeurs MBs montre une amplification des proto-oncogènes *MYC* (8q24), *MYCN* (2p24) ou *EGFR* (7p12). De plus, une seule étude faite par CGH a révélé une amplification des locus 2p24 et 8q24 dans 6% et 17%, respectivement, des tumeurs PNETs analysées (Schütz *et al.*, 1996). D'ailleurs, ce groupe a proposé que cette forte incidence d'amplification serait due aux variations statistiques ou bien à la

sensibilité élevée de la technique du CGH par rapport à l'analyse caryotypique. Toutefois, les études par CGH sur des tumeurs PNETs/MBs fraîches ne rapportent jusqu'à présent aucune amplification génique importante dans ces régions. Cependant, l'amplification du gène *c-myc* a été observée dans une proportion élevée de lignées cellulaires PNETs/MBs (Bigner *et al.*, 1990; Wasson *et al.*, 1990; Pietsch *et al.*, 1994); ce qui suggère que les clones cellulaires possédant cette amplification génique disposent d'un avantage sélectif de croissance *in vitro*. En ce qui concerne les amplifications sous forme de DM, elles sont retrouvées dans environ 10-20% des tumeurs MBs. Généralement, ces cas montrent également une amplification du gène *c-myc*, ou moins fréquemment, du gène *N-myc* (Bigner *et al.*, 1988, 1990b; Wasson *et al.*, 1990). Ainsi, l'amplification génique n'est vraisemblablement pas le principal mécanisme d'activation d'oncogènes dans les tumeurs MBs. D'ailleurs, dans la lignée UM-MB1, aucune amplification sous forme de DM n'a été observée. Par contre, à l'analyse du caryotype ainsi qu'au FISH, 10 copies de l'oncogène *c-myc* ont été détectées, puisque nous observons 5 fois les bras longs du chromosome 8 (Figure 1, Chapitre 3). Il en est de même pour l'oncogène *N-myc*, puisqu'on observe 6 signaux dans une forte proportion des cellules analysées; ce qui est confirmé également par l'analyse chromosomique (3 fois les bras courts du chromosome 2) (Figure 1, Chapitre 3). Toutefois, la présence de ces oncogènes en copies supplémentaires dans la lignée UM-MB1 ne constitue pas un haut niveau d'amplification génique.

4.4.2 Les anomalies chromosomiques dans le MB

Dans la littérature, plusieurs chromosomes ou régions chromosomiques pouvant être impliqués dans la pathogenèse des PNETs/MBs ont été rapportés. Ainsi, afin de clarifier cette banque considérable de données et de faciliter l'analyse de nos résultats, nous allons discuter de chacun des chromosomes pris individuellement. Dans la lignée UM-MB1, les chromosomes 18 et 20 ne révèlent aucune anomalie alors qu'au niveau des chromosomes 4, 14, 19 et 21, comme nous l'avons dit précédemment, une perte clonale a été observée; toutefois, puisque aucune anomalie importante n'apparaît dans l'ensemble des tumeurs PNETs/MBs étudiées dans la littérature, ces chromosomes ne seront pas discutés.

4.4.2.1 Chromosome 1

Les anomalies du chromosome 1 sont fréquemment impliquées dans les tumeurs pédiatrique solides (Douglass *et al.*, 1985). En effet, une perte allèlique au niveau du chromosome 1 est associée à la pathogenèse de certaines tumeurs embryonnaires, tels l'hépatoblastome et le neuroblastome (NB) (dans ces deux cas, la perte touche les bras courts du chromosome 1). D'ailleurs, pour le NB, deux locus de susceptibilité ont été identifiés, un en 1p36.1-2 et un autre localisé en 1p32 (Schleiermacher *et al.*, 1994). En ce qui concerne le MB, des études ont également identifié des anomalies cytogénétiques du chromosome 1, autant par l'analyse caryotypique (Biegel *et al.*, 1986, 1989; Griffin *et al.*, 1988; Sawyer *et*

al., 1991; Stratton *et al.*, 1991; Neumann *et al.*, 1993; Sainati *et al.*, 1996; Bigner *et al.*, 1997) que par la technique du CGH (Avet-Loiseau *et al.*, 1999; Nicholson *et al.*, 1999; Russo *et al.*, 1999). D'après ces données, ces altérations impliquent des réarrangements structuraux à la fois dans les bras courts et les bras longs du chromosome 1. Récemment, deux études moléculaires révèlent la présence d'une perte allélique (dans une région interstitielle) des bras longs du chromosome 1 dans une fraction significative de MBs (36%) (Kraus *et al.*, 1996; Pietsch *et al.*, 1997). Cette région inclut le locus *F13B* (*B subunit of the coagulation factor XIII*) en 1q31→q32.1: région candidate (également identifiée dans le cancer du sein) pour la présence de gènes suppresseurs de tumeur (Benítez *et al.*, 1997). Pour notre lignée UM-MB1, aucune anomalie du chromosome 1 n'a été observée.

4.4.2.2 Chromosome 2

En ce qui concerne les anomalies cytogénétiques du chromosome 2 dans les tumeurs PNETs/MBs, très peu ont été rapportées. Dans la lignée UM-MB1, nous avons identifié par mCGH deux régions sur-représentées au niveau de ce chromosome: une en 2p22→p24 (dans 22% des métaphases analysées) et une en 2q34→q36 (26%) (Figure 3, Chapitre 3). Parmi les analyses par CGH des tumeurs PNETs/MBs publiées, deux régions d'amplification ont également été détectées: en 2p24 (dans 6% des tumeurs analysées) (Schütz *et al.*, 1996) ainsi qu'en 2q14→q21 dans 3% (Nicholson *et al.*, 1999). La localisation du gène N-

myc (2p24) dans cette région d'amplification lui confère peut-être un rôle pathogénétique potentiel dans les PNETs/MBs. Cependant, cette aberration n'est retrouvée que dans un faible pourcentage de tumeurs PNETs/MBs (Rouah *et al.*, 1989; Fuller et Bigner, 1992). Néanmoins, il est bien connu que l'amplification du gène *N-myc* ainsi que l'augmentation de son produit génique sont associées à un mauvais pronostic chez les patients atteints d'un neuroblastome (NB) (Seeger *et al.*, 1985). Le réarrangement de la région 2qter→q34 dans la lignée UM-MB1 (présente en 4 copies) résulte d'une translocation réciproque déséquilibrée entre les chromosomes 2 et 3 [t(2;3)(q34;p13)] (Figure 1, Tableau I, Chapitre 3). De plus, l'analyse par mCGH révèle un gain de la région 2q34→q36 dans 26% des métaphases. Cette région 2q34-q36 est impliquée dans le rhabdomyosarcome alvéolaire (Heim et Mitelman, 1995). En effet, une translocation caractéristique entre le locus chromosomique 2q35 et celui du 13q14 a été identifiée dans ce cancer. Ce réarrangement chromosomique génère la fusion du gène *PAX3* (2q35), qui code pour un facteur de transcription impliqué dans la régulation du développement, avec un gène appelé *FKHR* (codant pour un facteur de transcription membre de la famille *fork head domain*) sur le chromosome 13q14 (Galili *et al.*, 1993). L'expression de ce gène chimérique (*PAX3-FKHR*) produit un facteur de transcription possédant des propriétés tumorigéniques.

4.4.2.3 Chromosome 3

Les anomalies touchant le chromosome 3 dans les tumeurs MBs implique en général surtout des délétions (Bigner *et al.*, 1988, 1997; Griffin *et al.*, 1988). Dans la lignée UM-MB1, nous avons observé la perte d'une copie d'une région des bras courts du chromosome 3: en 3pter→p13. L'étude par CGH de tumeurs PNETs sus-tentorielles a également révélé une perte fréquente de matériel au niveau du chromosome 3p, suggérant la perte d'un gène suppresseur de tumeur dans cette région (Nicholson *et al.*, 1999). Le gène *FHIT* (*fragile histidine triad gene*) représente un candidat potentiel. Ce gène, localisé au niveau d'un site fragile, en 3p14.2, est suspecté pour être impliqué dans le développement et la progression d'une variété de néoplasmes, incluant le carcinome rénal et le cancer du poumon à petites cellules (Sozzi G *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 1997). Toutefois l'analyse chromosomique, par CGH des tumeurs PNETs/MBs, a montrée aussi des régions d'amplification génomique intéressant les bras courts du chromosome 3. En effet, le groupe d'Avet-Loiseau (1999) a détecté des régions d'amplification génomique dans les locus 3p21 et 3p25 (chez le même patient), alors que l'équipe de Russo (1999), dans la région 3p21.2-p23. Par conséquent, ces résultats suggèrent la localisation de gènes dominants candidats en 3p.

4.4.2.4 Chromosome 5

Des anomalies structurales et numériques du chromosome 5 ont été rapportées dans les tumeurs PNETs/MBs (Biegel *et al.*, 1989; Fujii *et al.*, 1994; Agamanolis *et al.*, 1995; Bhattacharjee *et al.*, 1997). L'analyse par CGH de Schütz *et al.* (1996) révèle deux régions de gain récurrent, intéressant les portions distales des bras courts et longs du chromosome 5, dans 18% des tumeurs PNETs/MBs. Dans une autre étude, une amplification de la bande chromosomique 5p15.3 (un amplicon) a été également détectée par CGH dans deux MBs sur 31 par le groupe de Readon *et al.* (1997). En ce qui concerne la lignée UM-MB1, l'analyse caryotypique montre un réarrangement du chromosome 5, dû à une translocation non-équilibrée entre les chromosomes 5 et 19 (Figure 1, Chapitre 3). Notre analyse par mCGH rapporte aussi des changements au niveau du chromosome 5; il s'agit d'une sur-représentation des régions 5pter à p15 et de 5q32 à qter, qui a été observée dans une proportion toutefois beaucoup plus faible, dans 6% et 8% respectivement, des métaphases analysées (Figure 4, Tableau I, Chapitre 3). Actuellement, on ne connaît pas l'implication de ces régions d'amplification sur la pathogenèse des MBs.

4.4.2.5 Chromosome 6

Selon nos travaux effectués sur la lignée UM-MB1, aucune anomalie n'affecte le chromosome 6. Toutefois, dans 19% des tumeurs PNETs/MBs étudiées par les groupes de Griffin (1988) et de Biegel (1989), la perte totale ou d'un segment d'un chromosome 6 a été observée sans aucune autre anomalie, suggérant la présence d'un événement cytogénétique primaire. De plus, Biegel *et al.* (1995) ont détecté des réarrangements numériques ou structuraux du chromosome 6 dans 18% des PNETs analysées. Par approche moléculaire (LOH), Thomas et Raffel (1991) ont également identifié une perte des bras longs du chromosome 6 dans 22% des tumeurs PNETs/MBs. De façon intéressante, la perte du chromosome 6 est fréquemment retrouvée dans les tumeurs sans i(17q), définissant fort probablement, un sous-groupe de PNETs/MBs qui origine d'un événement cytogénétique initiateur différent (Biegel, 1997). La perte fréquente des bras longs du chromosome 6 a également été observée dans plusieurs tumeurs (surtout dans le rétinoblastome, mais également dans le neuroblastome), soit sous forme d'une délétion 6q ou d'un isochromosome des bras courts du chromosome 6 (Mitelman, 1994). Bien que dans plusieurs tumeurs, l'i(6p) représente le seul changement cytogénétique détectable, cette anomalie semble être associée le plus souvent à un événement relié surtout à la progression de la tumeur (Heim et Mitelman, 1995).

4.4.2.6 Chromosome 7

Dans la lignée UM-MB1, une portion des bras longs du chromosome 7, en 7q21→qter, est sur-représentée dans 60% des métaphases analysées (Figures 1, 3 et 4). Ceci représente, avec les chromosomes 15 et 22, le fragment chromosomique le plus fréquemment sur-représenté dans notre lignée. Ces résultats concordent avec les analyses par CGH de Schütz *et al.* (1996), dont 17% des échantillons PNETs présentent un gain en 7q. En ce qui concerne les 124 autres tumeurs PNETs/MBs analysées par CGH, l'amplification génomique de ce chromosome est également détectée dans 32% des cas (Reardon *et al.*, 1997; Avet-Loiseau *et al.*, 1999; Nicholson *et al.*, 1999; Russo *et al.*, 1999). De plus, parmi les 22 PNETs caryotypées, des copies supplémentaires du chromosome 7 sont identifiées dans 18% des tumeurs (Biegel *et al.*, 1989). Dans l'étude de Bhattacharjee *et al.* (1997), 50% des PNETs analysées montrent aussi une trisomie 7. Par conséquent, Biegel (1997) rapporte que la trisomie 7 représenterait le deuxième changement chromosomique le plus fréquent dans les PNETs/MBs (Biegel, 1997). De plus, ce gain de chromosomes 7 est souvent en association avec l'i(17q). Cet excès de copies du chromosome 7 a été également trouvé de façon récurrente dans d'autres tumeurs cérébrales (Bigner *et al.*, 1990a; Schrock *et al.*, 1996), de même que dans certains tissus non néoplasiques (par exemple le foie) (Bardi *et al.*, 1992; Johansson *et al.*, 1993). Ainsi, sa contribution potentielle aux événements oncogénétiques demeure encore incertaine. Toutefois, dans la tumorigenèse des carcinomes papillaires rénaux

héréditaires, la trisomie 7 accompagne de façon non aléatoire la duplication de l'allèle mutant du gène *MET* (connu aussi sous le terme de *c-met*) (Zhuang *et al.*, 1998). Cet oncogène, localisé en 7q31, appartient à la famille des récepteurs de facteur de croissance, possédant un site catalytique pour une activité tyrosine kinase, probablement responsable d'une sur-stimulation d'un grand nombre d'effecteurs intra-cellulaires.

4.4.2.7 Chromosome 8

Comme nous l'avons déjà mentionné, dans le paragraphe portant sur les amplifications géniques, nous avons détecté dans la lignée UM-MB1 une sur-représentation de la région chromosomique 8q (avec une perte réciproque des bras courts) dans 38% des métaphases (Figures 3 et 4, Chapitre 3). Le groupe de Reardon (1997) a également observé un gain du chromosome 8q et la perte réciproque des bras courts, résultant ainsi de la formation d'un isochromosome 8q dans 2 des 9 tumeurs MBs analysées. Bien que les conséquences tumorigéniques de cet événement cytogénétique ne soient pas encore bien connues au niveau moléculaire pour le MB, il représente dans le mélanome intra-oculaire de l'uvéa un changement caryotypique primaire important (Heim et Mitelman, 1995). De plus, selon l'analyse de Reardon *et al.* (1997), la perte du chromosome 8p est souvent associée à celle du chromosome 16q (anomalie également retrouvée dans la lignée UM-MB1), suggérant ainsi que la perte

commune de l'expression génique de ces deux régions, contribuerait de façon complémentaire au développement du MB.

4.4.2.8 Chromosome 9

L'absence des bras courts du chromosome 9 dans la lignée UM-MB1, constitue la perte la plus importante. En effet, cette perte découle de la formation de deux isochromosomes des bras longs du chromosome 9; il en résulte une absence totale des bras courts (nullisomie) (Figure 1, Chapitre 3). Les anomalies impliquant ce segment chromosomique (9p) sont rares dans le MB; seulement quatre cas isolés ont été rapportés (Griffin *et al.*, 1988; Vagner-Capodano *et al.*, 1994; Bhattacharjee *et al.*, 1997). Toutefois, puisque l'altération des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire influence l'évolution d'une variété de néoplasmes chez l'humain, des analyses de mutation ou de délétion du gène *p16* (p16INK4 ou CDKN2), situé en 9p21 et codant pour un inhibiteur de l'activité kinasique de Cdk4, ont été effectuées. Cependant, il s'avère que ce gène ne supporte pas son rôle dans les tumeurs MBs (Sato *et al.*, 1996; Barker *et al.*, 1997). Ainsi, selon ces résultats, la perte du 9p observée dans la lignée UM-MB1 ne semble pas constituer un événement génétique important dans le MB. Néanmoins, les réarrangements structuraux du 9p sont fréquemment impliqués dans les gliomes malins, de même que dans les leucémies lymphoblastiques aiguës (LLA) (López-Ginés *et al.*, 1997; Heim et Mitelman, 1995). La perte fréquente de matériel génétique en 9p chez ces patients indique la localisation

d'un gène suppresseur de tumeur potentiel. Les recherches effectuées jusqu'à présent associent cette perte du 9p avec celle du locus *IFN* (*interferon gene*), localisé en 9p22.

En plus de la perte des bras courts du chromosome 9, la lignée UM-MB1 montre, au mCGH, une région sur-représentée en 9q22 à qter dans un faible pourcentage des métaphases analysées (18%) (Figures 3 et 4, Chapitre 3). Malgré son rôle peu probable dans la tumorigenèse du MB, le gain du segment chromosomique 9q avec la perte réciproque du 9p ont également été observés par CGH dans un spécimen MB (Reardon *et al.*, 1997).

4.4.2.9 Chromosome 10

Dans la lignée UM-MB1, une délétion terminale des bras longs du chromosome 10, en 10q24~26→qter, a été observée (Figure 1, chapitre 3). D'une manière générale, la perte de séquences dans cette région est associée à la progression de plusieurs cancers. En effet, les altérations de la région 10q22-q25 ont été rapportées dans les carcinomes de la prostate, du rein, du poumon à petites cellules et de l'endomètre, ainsi que dans le mélanome et le méningiome (Steck *et al.*, 1997). Au niveau des gliomes de grade élevé, la perte distale du chromosome 10q représente un des changements les plus fréquents. Par conséquent, cet événement suggère la présence d'un ou de plusieurs locus suppresseur(s) de tumeur. En effet, des gènes suppresseurs de tumeur candidats

ont été identifiés, tel le gène *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog gene*), localisé en 10q23, qui semble cependant être restreint aux gliomes de grade élevé chez l'adulte (Rasheed *et al.*, 1997). Il y a également le gène *MMAC1* (*mutated in multiple advanced cancers 1*), localisé en 10q23.3, dont la perte de fonction semble être associée à l'oncogenèse de plusieurs cancers (Steck *et al.*, 1997). De plus, la région chromosomique 10q24-q25, comprenant le gène *MXI1* (un gène membre de la famille bHLH), constitue une région fréquemment touchée dans les leucémies lymphoblastiques aiguë (LLA) et chronique (LLC) (Shapiro *et al.*, 1994). Dans un sous-groupe de MBs, ainsi que dans le glioblastome multiforme (Mollenhauer *et al.*, 1997) et le cancer du poumon (Wu *et al.*, 1999), le gène *DMBT1* (*deleted in malignant brain tumours*), localisé en 10q25.3-q26.1, est suspecté pour être impliqué dans la carcinogenèse des ces tumeurs.

Les analyses par CGH appuient ces données. La perte récurrente des bras longs du chromosome 10 est retrouvée dans 25% des tumeurs PNETs/MBs (Schütz *et al.*, 1996; Reardon *et al.*, 1997; Avet-Loiseau *et al.*, 1999; Nicholson *et al.*, 1999; Russo *et al.*, 1999). Deux études, par approche moléculaire (LOH), ont également confirmé cette perte en 10q. Le groupe de Scheurlen *et al.* (1998) l'a retrouvée dans 20.6% des échantillons PNETs/MBs alors que le groupe de Blaeker (1996) a défini une perte de la région 10q24-q26 dans 3 tumeurs MBs sur 4. De plus, des réarrangements structuraux impliquant la même région (10q24~26) ont été observés dans deux lignées MBs (MHH-MED-1 et MHH-

MED-2) (Pietsch *et al.*, 1994). Cette région identifiée par ces deux études correspond à la même perte chromosomique 10q24~26→qter, retrouvée dans la lignée UM-MB1. Par conséquent, l'ensemble de ces résultats renforcent la candidature, de même que la présence d'un ou de plusieurs locus suppresseurs de tumeur, dans la portion terminale des bras longs du chromosome 10; locus qui seraient potentiellement impliqués dans la tumorigenèse du MB.

4.4.2.10 Chromosome 11

Les aberrations numériques et structurales du chromosome 11 sont relativement fréquentes dans les PNETs/MBs (Bigner *et al.*, 1988; Griffin *et al.*, 1988; Callen *et al.*, 1989; Biegel *et al.*, 1989, 1995; Fujii *et al.*, 1994; Sainati *et al.*, 1996). Par CGH, le groupe de Reardon (1997) et celui de Avet-Loiseau (1999) ont détecté la perte d'un chromosome 11 dans 40% des PNETs/MBs étudiées. Pour leur part, Nicholson *et al.* (1999) et Russo *et al.* (1999) ont révélé une perte des bras courts du chromosome 11 dans 19% des tumeurs. De plus, James *et al.* (1990) furent les premiers à rapporter une perte allélique en 11p dans 27% des MBs. De façon plus précise, l'équipe de Fults (1992) définit une région de perte d'hétérozygotie en 11p15-pter (distinct du gène c-H-ras) dans 27% des tumeurs. Bien que ces résultats ne soient pas confirmés par Albrecht *et al.* (1994), les analyses cytogénétiques de Blaeker *et al.* (1996) montrent une délétion des bras courts ou des bras longs du chromosome 11 dans 3 tumeurs MBs sur 5. En ce qui concerne la lignée cellulaire MHH-MED-2, l'analyse

caryotypique montre un réarrangement de la région 11q24-q25 (Piestch *et al.*, 1994). Selon toutes ces observations, il semble que les altérations du chromosome 11 dans le MB résultent de translocations non-équilibrées, occasionnant des délétions à la fois au niveau du 11p et du 11q. Les anomalies du chromosome 11 observées dans la lignée UM-MB1 concordent avec ces résultats. En effet, nous avons détecté une perte des segments 11pter→p13 et 11q13→qter (Figure 1, Chapitre 3). Les gènes situés dans ces segments, ainsi que leur implication dans la pathogenèse des MBs, demeurent encore inconnus. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer le rôle potentiel de ces pertes génomiques récurrentes dans le MB.

4.4.2.11 Chromosome 12

Les analyses cytogénétiques classiques des PNETs/MBs décrivent rarement des anomalies au niveau du chromosome 12. Par contre, si elles sont présentes, elles sont sous forme de gain ou de perte (Biegel *et al.*, 1989). Sur un total de 42 PNETs/MBs étudiées par les groupes de Vagner-Capodano *et al.* en 1994 et de Bhattacharjee *et al.* en 1998, des copies supplémentaires du chromosome 12 ont été retrouvées dans 4 tumeurs. Par CGH, des régions d'amplification de haut niveau ont été également détectées sur le chromosome 12: sur les bras courts du chromosome 12 par l'équipe de Avet-Loiseau *et al.* (1999) et plus spécifiquement en 12p13 par le groupe de Nicholson *et al.* (1999). En ce qui concerne les bras longs, l'amplification génomique touche les régions

12q23-q24 (16% des tumeurs analysées) (Nicholson *et al.*, 1999), 12q24 (19%) (Reardon *et al.*, 1997) et 12q22 (7%) (Russo *et al.*, 1999). Dans la lignée UM-MB1, nous avons aussi détecté dans 28% des métaphases analysées un gain récurrent de la région 12q22→qter par mCGH (Figures 2B, 3 et 4, Chapitre 3). L'analyse chromosomique révèle également un gain de cette région (6 copies). Dans le MB, le rôle du gène *Eps8* (*epidermal growth factor receptor pathway substrate 8*), localisé en 12q23-q24, dont la sur-expression de son produit augmente la réponse mitogénique du facteur de croissance EGF (*epidermal growth factor*), a déjà été proposé (Nicholson *et al.*, 1999). Cependant, des études additionnelles sont aussi nécessaires afin d'évaluer l'importance relative de ce gène dans les tumeurs PNETs/MBs.

4.4.2.12 Chromosome 13

Pour la lignée UM-MB1, un signal d'amplification a été détecté en 13q12→q14 dans 16% des métaphases analysées au mCGH (Figures 3 et 4, Chapitre 3). Cependant, les anomalies du chromosome 13 ne se retrouvent pas de façon récurrente dans le MB. En effet, l'étude de 25 tumeurs PNETs/MBs, par approche moléculaire, ne signale aucune perte de l'hétérozygotie au niveau du chromosome 13 (James *et al.*, 1990; Raffel *et al.*, 1990). De plus, par CGH, une seule tumeur MB présente une région d'amplification en 13q33 (Nicholson *et al.*, 1999); alors que d'autres études par CGH ne révèlent rien de significatif (Schütz *et al.*, 1996; Reardon *et al.*, 1997; Avet-Loiseau *et al.*, 1999; Russo *et*

al., 1999). Parmi les 81 tumeurs PNETs/MBs caryotypées (Biegel *et al.*, 1989; Karnes *et al.*, 1992; Fujii *et al.*, 1994; Bhattacharjee *et al.*, 1997; Bigner *et al.*, 1997), 15 cas présentent des anomalies numériques du chromosome 13 (gain ou perte), alors que 2 cas montrent l'ajout de matériel génétique de nature inconnue dans la région 13q34 (Bhattacharjee *et al.*, 1997; Bigner *et al.*, 1997). Par contre, dans la série des 7 lignées cellulaires MBs caryotypées par Bigner *et al.* (1989), 3 lignées montrent des anomalies du chromosome 13. La lignée D-276-MED présente un isochromosome (13q), anomalie également retrouvée dans la lignée DAOY (Jacobsen *et al.*, 1985); la lignée D-278-MED présente une perte d'un chromosome 13 et D-306-MED, une $t(13?;20)(q13?;q13)$. Parmi les 5 lignées PNETs/MBs analysées par le groupe de Pietsch (1994), une translocation impliquant la région 13q14 dans la lignée MHH-PNET-1 a été observée. Enfin, des chromosomes DM, résultant de l'amplification ou de la fragmentation du chromosome 13, sont également observés dans la lignée cellulaire MB Dev (Derrington *et al.*, 1998). Selon toutes ces analyses, les modifications touchant le chromosome 13 sont plus fréquentes dans les lignées cellulaires PNETs/MBs que dans les tumeurs fraîches; ce qui pourrait leur donner, comme pour l'amplification de *c-myc*, un avantage sélectif de croissance. Finalement, puisque l'ensemble des anomalies du chromosome 13 se présente plutôt de façon aléatoire dans les tumeurs MBs, aucune fonction pathologique potentielle ne peut leur être attribuée pour le moment.

4.4.2.13 Chromosome 15

L'implication du chromosome 15 dans les tumeurs PNETs/MBs n'a été que très rarement signalée dans la littérature. Cependant, dans la lignée UM-MB1, nous avons détecté par mCGH un gain des bras longs du chromosome 15 dans 80% des métaphases analysées. Celui-ci représente le segment chromosomique le plus fréquemment sur-représenté dans notre lignée (Figures 3 et 4, Chapitre 3). De même, l'analyse par FISH ainsi que le caryotype montrent la présence de 5 copies de la région 15q15 à qter (Figures 1 et 2C, Chapitre 3). Le groupe de Fujii (1994) a également observé une copie supplémentaire du chromosome 15 dans 23% des tumeurs PNETs/MBs étudiées. Ce gain important de matériel génomique, observé au niveau des bras longs du chromosome 15 dans la lignée UM-MB1, représente peut-être une nouvelle région d'intérêt dans les PNETs/MBs; aussi ne représente-t-il peut-être qu'un événement particulier et spécifique de notre lignée. Il est donc impératif de poursuivre les analyses CT et moléculaires sur d'autres lignées afin de préciser son importance dans la pathogenèse du MB.

4.4.2.14 Chromosome 16

Biegel *et al.* (1989) ont observé des anomalies structurales impliquant les bras longs du chromosome 16 dans 23% des PNETs caryotypées, dont une tumeur présentant comme seul changement cytogénétique une délétion en

16q11.2. Dans la lignée UM-MB1 nous avons également détecté la perte de cette région; 2 copies de la région 16q11.2→qter sont perdues (Figures 1 et 2D, Chapitre 3). De plus, parmi les lignées cellulaires PNETs analysées cytogénétiquement, MHH-MED-2 et MHH-MED-4 possèdent une altération de la région 16q24 (Pietsch *et al.*, 1994). L'évaluation des déséquilibres génomiques des tumeurs PNETs/MBs par CGH révèle également une perte (partielle ou entière) des bras chromosomiques 16q dans 24% des cas (Reardon *et al.*, 1997; Avet-Loiseau *et al.*, 1999; Nicholson *et al.*, 1999; Russo *et al.*, 1999). Des études de LOH confirment ces résultats: 20% des tumeurs PNETs/MBs montrent une perte allélique dans la bande 16q22. Il est bien connu que les réarrangements structuraux de la région 16q22 sont associés à l'augmentation du compte d'éosinophiles chez les patients atteints d'une leucémie myéloïde aiguë (classée AML-M4_{EO}). Il semble que l'altération du gène *CBFB*, localisé en 16q22 et qui code pour une sous-unité d'un facteur de transcription hétérodimère, contribuerait à cette transformation leucémique (Heim et Mitelman, 1995). Ainsi, une fois de plus, la lignée UM-MB1 possède une région chromosomique impliquée de façon non aléatoire dans l'ensemble des tumeurs PNETs/MBs étudiées, région dont la fonction reste à déterminer.

4.4.2.15 Chromosome 17

Bien que l'altération du chromosome 17, sous forme d'isochromosome des bras longs (perte du 17p/gain du 17q), représente l'anomalie structurale la

plus fréquente dans les tumeurs PNETs/MBs, jusqu'à ce jour, aucune donnée ne permet de déterminer précisément le rôle de sa manifestation dans la tumorigenèse de ces tumeurs (voir section 1.6.4., Chapitre 1). En ce qui concerne la lignée UM-MB1, nous n'avons pas détecté d'i(17q). Cependant, des déséquilibres touchant ce chromosome ont été observés: un gain de la région terminale des bras longs de 17q21 à qter, ainsi qu'une perte de 2 copies touchant à la fois la totalité des bras courts et la région 17q10 à q12 (Figures 1, 2E, 3 et 4, Chapitre 3). La perte des bras courts du 17 a été aussi mise en évidence par hybridation *in situ* de la sonde du gène *TP53* (17p13.1): les signaux n'apparaissent que sur deux chromosomes. Les analyses par CGH des PNETs/MBs, ont de plus montré un gain des bras longs du chromosome 17 dans une forte proportion de tumeurs (39%) (Schütz *et al.*, 1996; Readon *et al.*, 1997; Avet-Loiseau *et al.*, 1999; Nicholson *et al.*, 1999; Russo *et al.*, 1999). Toutefois, le rôle potentiel de ce gain dans la tumorigenèse de ces tumeurs, contrairement à la perte des bras courts du chromosome 17, demeure encore peu exploité. De façon intéressante, le groupe de Meddeb (1996) a détecté, par FISH, une sur-représentation de la région 17q23.1 à qter (région également amplifiée dans la lignée UM-MB1), dans environ 90% des neuroblastomes (NBs) de grade élevé. Puisque le MB et le NB sont deux tumeurs PNETs, un événement tumorigénétique commun peut être envisagé, même si jusqu'à présent aucun gène candidat n'a été identifié. De plus, l'amplification de la région 17q22-q23 observée dans le cancer du sein, mais également dans un cas de méningiome,

suggère la présence d'une région critique d'oncogène(s) candidat(s) (Khan *et al.*, 1998).

Malgré le peu d'information publiée sur la cytogénétique et la génétique moléculaire des tumeurs PNETs sus-tentorielles, les travaux de Burnett *et al.* (1997) ne révèlent aucune perte du chromosome 17p dans une série de 8 spécimens. De plus, l'analyse de 14 PNETs sus-tentorielles par CGH, rapporte aucune altération du chromosome 17 (Nicholson *et al.*, 1999; Russo *et al.*, 1999). L'ensemble de ces résultats indique que les aberrations génétiques des PNETs/MBs diffèrent de celles des PNETs sus-tentorielles. Donc, bien qu'elles expriment des patrons histologiques similaires, ces tumeurs semblent représenter des entités biologiques distinctes.

4.4.2.17 Chromosome 22

En ce qui concerne le chromosome 22, c'est la monosomie 22 qui est la mieux documentée dans la littérature; elle peut-être observée jusque dans 30% des cas de PNETs/MBs (Biegel *et al.*, 1989; Bhattacharjee *et al.*, 1997; Bigner *et al.*, 1997). D'ailleurs certains chercheurs ont rapporté qu'elle pourrait représenter un changement primaire dans ces tumeurs (James *et al.*, 1990; Vagner-Capodano *et al.*, 1989). Cette anomalie a été également retrouvée dans une grande variété de tumeurs du SNC (épendymomes, méningiomes et tumeurs gliales) (Agamanolis et Malone, 1995). La monosomie 22 est présente dans

environ 60% des tumeurs rhabdoïdes du SNC ou des tumeurs rhabdoïdes/tératoïdes atypiques (ATT/Rh) (Rorke *et al.*, 1996). De plus, une perte récurrente de la région 22q11.2 a été identifiée chez les enfants atteints d'une tumeur ATT/Rh, impliquant ainsi la localisation potentielle d'un gène suppresseur de tumeur (Biegel, 1997). Par contre, parmi trois études de CGH sur les tumeurs PNETs/MBs, la perte des bras longs du chromosome 22 est observée dans seulement 13% des échantillons analysés (Reardon *et al.*, 1997; Nicholson *et al.*, 1999; Russo *et al.*, 1999), alors que les études de Schütz *et al.* en 1996 et d'Avet-Loiseau *et al.* en 1999, ne rapportent aucune perte, ni gain du chromosome 22.

Contrairement à ce qui est rapporté le plus souvent dans la littérature, dans la lignée UM-MB1 nous avons observé, non pas une perte, mais une sur-représentation du chromosome 22q et cela, dans 60% des métaphases analysées par mCGH (Figures 3 et 4, Chapitre 3). Certaines études révèlent également une sur-représentation du chromosome 22q. Par exemple, Karnes *et al.* (1992) ont observé 2 copies supplémentaires du chromosome 22 dans 2 tumeurs PNETs para-tétraploïdes sur 11 spécimens frais analysés; alors que le groupe de Fujii (1994) ont trouvé une copie supplémentaire de ce chromosome dans 2 tumeurs PNETs/MBs para-triploïdes sur 13 échantillons. Tout comme pour le chromosome 15, des études additionnelles sont nécessaires afin de vérifier si cet excès de copies du chromosome 22 peut jouer un rôle pathogénique potentiel dans le MB, ou s'il représente plutôt une caractéristique de la lignée UM-MB1.

Par ailleurs, les réarrangements du chromosome 22, dont les locus 22q11 et 22q12, sont reconnus pour participer à l'oncogenèse de nombreux cancers. En effet, la translocation $t(9;22)(q34;q11)$ dans la LMC produit un gène de fusion chimérique *BCR(22q11)-ABL(9q34)*, codant pour une tyrosine kinase qui ne répond pas aux contrôles normaux. Alors que la $t(8;22)(q24;q11)$, dans le lymphome de Burkitt, place le locus des chaînes légères (λ) d'immunoglobuline (*IGL*) (22q11) dans le voisinage de l'oncogène *MYC* (8q24), entraînant ainsi l'activation constitutive des gènes de ce locus d'immunoglobuline (Heim et Mitelman, 1995). En ce qui concerne le locus 22q12 (localisation du gène *EWS*), il contribue à la formation de plusieurs gènes de fusion, dont la nature du produit chimérique est un facteur de transcription impliqué dans la carcinogenèse du sarcome d'Ewing, du mélanome malin des parties molles, ainsi que de la tumeur desmoplasique à petites cellules rondes (Strachan et Read, 1998).

4.4.2.18 Chromosomes sexuels

Généralement, la perte des chromosomes sexuels est fréquente dans les néoplasmes. Dans la lignée UM-MB1, la perte clonale de 2 copies du chromosome X a été retrouvée (Figure 1, Chapitre 3). L'analyse caryotypique de la lignée DAOY (cellules para-tétraploïdes) révèle également une perte d'un chromosome sexuel. En effet, la perte du chromosome Y est rapportée dans 90% des cellules de cette lignée (Jacobsen *et al.*, 1985). En ce qui concerne l'analyse chromosomique de 22 tumeurs PNETs/MBs par l'équipe de Biegel *et al.* (1989),

une perte des chromosomes sexuels est notée dans 6 cas. Les études par CGH révèlent également une perte totale du chromosome X dans 17% et du Y dans 18% des tumeurs PNETs/MBs analysées (Reardon *et al.*, 1997; Avet-Loiseau *et al.*, 1999; Nicholson *et al.*, 1999; Russo *et al.*, 1999). Toutefois, l'analyse d'échantillons de tissus cérébraux normaux a montrée également une perte de chromosomes sexuels. Ainsi, certains observateurs croient que cette anomalie (tout comme la trisomie 7) serait une propriété du tissu normal (Heim *et al.*, 1989). D'ailleurs, la présence de cellules avec une constitution chromosomique à 45, X est augmentée de façon significative chez les femmes âgées (Therman et Susman, 1993).

5. CONCLUSION GÉNÉRALE

5. CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objet de cette étude a été d'effectuer une caractérisation cytogénétique complète de la lignée cellulaire UM-MB1, afin de permettre une meilleure compréhension des événements cytogénétiques impliqués dans l'apparition et le développement du MB. De plus, malgré l'utilisation répandue des lignées cellulaires PNETs/MBs comme modèles servant à l'étude des mécanismes de tumorigenèse du MB (mais également pour des fins de diagnostic, pronostic et thérapeutique), UM-MB1 constitue la première lignée PNET/MB à être caractérisée de façon aussi détaillée à la fois par le caryotype, la FISH et la mCGH.

Les résultats obtenus révèlent que la lignée UM-MB1 possède de nombreuses altérations chromosomiques récurrentes et représentatives de l'ensemble des tumeurs PNETs/MBs. En effet, les régions chromosomiques sur-représentées, impliquant une portion ou la totalité des bras longs des chromosomes 7, 8, 12, et 17, de même que la perte des régions chromosomiques 10q, 11p, 11q, 16q et 17p, constituent des événements non aléatoires décrits dans les PNETs/MBs. Suite à nos travaux, nous avons aussi identifié, dans une forte proportion de métaphases, deux nouvelles régions de gain intéressant les bras longs des chromosomes 15 et 22. Ce surplus de matériel génomique suggère peut-être l'existence de nouvelles régions potentiellement impliquées dans la pathogenèse du MB. Ainsi, par cette évaluation chromosomique détaillée

et sa concordance avec les tumeurs PNETs/MBs déjà décrites dans la littérature, la lignée UM-MB1 devient un outil indispensable pour l'identification des gènes potentiellement impliqués dans le MB. En effet, l'analyse chromosomique détaillée des lignées cellulaires telle que UM-MB1 pourra jouer un rôle important en révélant la localisation et le mode d'activation de ces gènes, permettant ainsi de faire avancer notre connaissance sur les mécanismes d'apparition et de développement du processus néoplasique dans les PNETs/MBs.

Cette étude révèle également l'importance de l'analyse conjointe du caryotype et de la cytogénétique moléculaire, afin d'obtenir une caractérisation plus précise des déséquilibres chromosomiques. L'utilisation de la technique du mCGH s'est avérée profitable pour l'évaluation des régions chromosomiques sur-représentées dans la lignée UM-MB1. En effet, grâce à cette technique, nous avons pu révéler et préciser tous les gains trouvés à l'analyse caryotypique, de même qu'identifier de nouvelles régions potentiellement candidates. La cytogénétique du cancer a été grandement stimulée par l'arrivée de nouvelles techniques comme la mCGH et la CGH. En effet, l'augmentation considérable de la sensibilité de détection, par l'utilisation de ces techniques, permet l'identification d'anomalies chromosomiques qui autrement seraient passées inaperçues dans les cellules malignes.

Bref, une série de changements chromosomiques (et par conséquent, génomiques) impliquant des oncogènes et/ou des gènes suppresseurs de tumeur sont sûrement nécessaires au développement des tumeurs PNETs/MBs. Toutefois, deux questions se posent: quels sont ces changements et comment contribuent-ils à la tumorigenèse de ces tumeurs? Il est alors indispensable de distinguer entre les changements primaires, impliqués dans la phase d'initiation tumorale, et les événements secondaires, importants dans le maintien et l'évolution d'un phénotype malin. Par conséquent, l'étude de l'implication des gènes dans le cancer doit s'appuyer non seulement sur la biologie moléculaire et la biochimie, mais également sur une analyse chromosomique à haute résolution grâce à la cytogénétique moléculaire. Nous espérons, grâce à ce travail, avoir mis en évidence quelques-uns des nombreux avantages de cette analyse ainsi que l'importance de lignées bien caractérisées, telle la UM-MB1.

6. BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

6. BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

Adesina AM, Nalbantoglu J, Cavenee WK (1994): p53 gene mutations and mdm2 gene amplification are uncommon in medulloblastoma. *Cancer Res* 54: 5649-5651.

Albrecht S, von Deimling A, Pietsch T, Giangaspero F, Brandner S, Kleihues P, and Wiestler OD (1994): Microsatellite analysis of loss of heterozygosity on chromosome 9q, 11p and 17p in medulloblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20: 74-81.

Albrecht S, Waha A, Koch A, Kraus JA, Goodyer CG, Pietsch T (1996): Variable imprinting of H19 and IGF2 in fetal cerebellum and medulloblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 1270-1276.

Albright AL, Wisoff JH, Zeltzer PM (1996): Effects of medulloblastoma resections on outcome in children: a report from the Children's Group Cancer. *Neurosurg* 38: 265-271.

An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1995). Editor: Felix Mitelman. Karger Publishers in collaboration with Cytogenetics and Cell Genetics.

Avet-Loiseau H, Vénuat A-M, Terrier-Lacombe M-J, Lellouch-Tubiana A, Zerah M, Vassal G (1999): Comparative genomic hybridization detects many recurrent imbalances in central nervous system primitive neuroectodermal tumors in children. *Br J Cancer* 79: 1843-1847.

Badiali M, Pession A, Basso G, Andreini L, Rigobello L, Galassi E, Giangaspero F (1991): *N-myc* and *c-myc* oncogenes amplification in medulloblastoma: evidence of particularly aggressive behaviour of a tumor with *c-myc* amplification. *Tumori* 77: 118-121.

Badiali M, Iolascon A, Loda M (1993): p53 mutations in medulloblastoma. Immunohistochemistry gel shift analysis and sequencing. *Diagn Mol Pathol* 2: 23-28.

Bailey P, Cushing H (1925): Medulloblastoma cerebelli, a common type of midcerebellar glioma of childhood. *Arch Neurol Psychiat* 14: 192-224.

Bardi G, Johansson B, Pandis N, Heim S, Mandahl N, Hagerstrand I, Holmin T, Andren-Sandberg A, Mitelman F (1992): Trisomy 7 in nonneoplastic focal steatosis of the liver. *Cancer Genet Cytogenet* 63: 22-24.

Barel D, Avigad S, Michovitz S, Cohen IJ, Zaizov R (1997): Infrequent p53 mutation and mdm-2 gene amplification in childhood brain tumors. *Int J Pediatr Hematol/Oncol* 4: 91-100.

Barker FG, Chen P, Furman F, Aldape KD, Edwards MSB, Israel MA (1997): P16 deletion and mutation in human brain tumors. *J Neuro-Oncol* 31: 17-23.

Batra SK, McLendon RE, Koo JK, Castelino-Prabhu S, Fuchs HE, Krischer JP, Friedman HS, Bigner DD, Bigner (1995): Prognostic implications of chromosome 17p deletions in human medulloblastomas. *J Neuro-Oncol* 24: 39-45.

Benítez J, Osorio A, Barroso A, Arranz E, Díaz-Guillén MA, Robledo M, Rodríguez de Córdoba S, Heine-Suñer D (1997): A region of allelic imbalance in 1q31-32 in primary breast cancer coincides with a recombination hot spot. *Cancer Res* 57: 4217-4220.

Biegel JA, Rorke LB, Packer RJ, Sutton LN, Schut L, Bonner K, Emanuel BS (1989): Isochromosome 17q in primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Genes Chromosom Cancer* 1: 139-147.

Biegel JA, Burk CD, Barr FG, Emanuel BS (1992): Evidence for a 17p tumor related locus distinct from p53 in pediatric primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 52: 3391-3395.

Biegel JA, Rorke LB, Janss AJ, Sutton LN, Parmiter AH (1995): Isochromosome 17q demonstrated by interphase fluorescence in situ hybridization in primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Genes Chromosom Cancer* 14: 85-96.

Biegel JA (1997): Genetics of pediatric central nervous system tumors. *J Pediatr Hematol Oncol* 19: 492-501.

Biegel JA, Janss AJ, Raffel C, Sutton L, Rorke LB, Harper JM, Phillips PC (1997): Prognostic significance of chromosome 17p deletions in childhood primitive neuroectodermal tumors (medulloblastomas) of the central nervous system. *Clin Cancer Res* 3: 473-478.

Biegel JA, Wentz E (1997): No preferential parent origin for the isochromosome 17q in childhood primitive neuroectodermal tumor (medulloblastoma). *Genes Chromosom Cancer* 18: 143-146.

Bigner SH, Mark J, Friedman HS, Biegel JA, and Bigner DD (1988): Structural chromosomal abnormalities in human medulloblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 30: 91-101.

Bigner SH, Mark J, Bigner DD (1990a): Cytogenetics of human brain tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 47: 141-154.

Bigner SH, Friedman HS, Vogelstein B, Oakes J, Bigner DD (1990b): Amplification of the *c-myc* gene in human medulloblastoma cell lines and xenografts. *Cancer Res* 50: 2347-2350.

Blaeeker H, Rasheed ABK, McLendon RE, Friedman HS, Batra SK, Fuchs HE, and Bigner SH (1996): Microsatellite analysis of childhood brain tumors. *Genes Chromosom Cancer* 15: 54-63.

Bruggers CS, Fults D, Perkins SL, Coffin CM, Carroll WL (1999): Coexpression of genes involved in apoptosis in central nervous system neoplasms. *J Pediatr Hematol Oncol* 21: 19-25.

Burger PC, Scheithauer BW (1994): Tumors of the central nervous system. In: *Atlas of tumor pathology*. Published by the Armed forces institute of pathology, Washington, D.C. pp205-224.

Burnett ME, White EC, Sih S, von Haken MS, Cogen PH (1997): Chromosome arm 17p deletion analysis reveals molecular genetic heterogeneity in supratentorial and infratentorial primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Genet Cytogenet* 97: 25-31

Calaminus G, Janben G, Lenard H-G, Bock WJ, Reifenberger G, Schmitt G, Göbel U (1998): Combined therapy of medulloblastoma review of 46 patients treated in a single institution. *Neuropediatr* 29: 102-107.

Cogen PH, Daneshvar L, Metzger AK, Duyk G, Edwards MSB (1990): Deletion mapping of the medulloblastoma locus on chromosome 17p. *Genomics* 8: 279-285.

Cogen PH, Daneshvar L, Metzger AK, Duyk G, Edwards MSB, Sheffield VC (1992): Involvement of multiple chromosome 17p loci in medulloblastoma tumorigenesis. *Am J Hum Genet* 50: 584-589.

Cogen PH, McDonald JD (1996): Tumor suppressor genes and medulloblastoma. *J Neuro-Oncol* 29: 103-112.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL (1994): *Pathologic basis of disease*. 5th edition. W.B. Saunders Compagny. USA.

Cowan R, Hoban P, Kelsey A, Birch JM, Gattamaneni R, Evans DGR (1997): The gene for the naevoid basal cell carcinoma syndrome acts as a tumour-suppressor gene in medulloblastoma. *Br J Cancer* 76(2): 141-145.

Darling JL and Warr TJ (1998): Biology and genetics of malignant brain tumours. *Current Op Neurol* 11: 619-625.

Derrington EA, Dufay N, Rudkin BB, Belin M-F (1998): Human primitive neuroectodermal tumour cells behave as multipotent neural precursors in response to FGF2. *Oncogene* 17: 1663-1672.

Douglass EC, Green AA, Hayes FA, Etcubanas E, Horowitz M, Wilimas JA (1985): Chromosome 1 abnormalities: a common feature of pediatric solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 75: 51-54.

Ellenberg L, McComb JG, Siegel SE, Stowe S (1987): Factors affecting intellectual outcome in pediatric brain tumor patients. *Neurosurg* 21: 638-644.

Emadian SM, McDonald JD, Gerken SC, Fults D (1996): Correlation of chromosome 17p loss with clinical outcome in medulloblastoma. *Clin Cancer Res* 2: 1559-1564.

Felix CA, Nau MM, Takahashi T, Mitsudomi T, Chiba I, Poplack DG, Reaman GH, Cole DE, Letterio JJ, Whang Peng J, Knusten T, Minna JD (1992): Hereditary and acquired p53 gene mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 89: 640-647.

Fienberg AP (1995): Genomic imprinting and gene activation in cancer. *Nat Genet* 4: 110-113.

Friedman HS, Bigner SH, McComb RD, Schold SC, Pasternak JF, Groothuis DR, Bigner DD (1983): A model for a human medulloblastoma: growth, morphology, and chromosomal analysis *in vitro* and in athymic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 42: 485-503.

Friedman HS, Burger PC, Bigner SH, Trojanowski JQ, Wikstrand CJ, Halperin EC, Bigner DD (1985): Establishment and characterization of the human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft D283 Med. *J Neuropathol Exp Neurol* 44: 592-605.

Friedman HS, Burger PC, Bigner SH, Trojanowski JQ *et al.* (1988): Phenotypic and genotypic analysis of a human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft (D341 Med) demonstrating amplification of *c-myc*. *Am J Pathol* 130: 472-484.

Friedman HS, Oakes WJ, Bigner SH, Wikstrand CJ, Bigner D.D (1991): Medulloblastoma: tumor biological and clinical perspectives. *J Neuro-Oncol* 11: 1-15.

Fujii Y, Hongo T, and Hayashi Y (1994): Chromosome analysis of brain tumors in childhood. *Genes Chromosom Cancer* 11: 205-215.

Fuller GN, Bigner SH (1992): Amplified cellular oncogenes in neoplasms of the human central nervous system. *Mutation Res* 276: 299-306.

Fults D, Petronio J, Noblett, Pedone CA (1992): Chromosome 11p15 deletions in human malignant astrocytomas and primitive neuroectodermal tumors. *Genomics* 14: 799-801.

Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher III FJ, Emanuel BS, Rovera G, Barr FG (1993): Fusion of a fork head domain gene to *PAX3* in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet* 5: 230-235.

Giangaspero F, Bigner SH, Giordana MT, Kleihues P, Trojanowski JQ (1997): Medulloblastoma. In: *Pathology & Genetics: Tumours of the Nervous System*. Edited by Kleihues P and Cavenee WK. International Agency for Research Cancer, Lyon.

Gilbertson RJ, Pearson ADJ, Perry RH, Kelly P, Pearson ADJ (1995): Prognostic significance of the c-erb B2 oncogene product in childhood medulloblastoma. *Br J Cancer* 71: 473-477.

Gilbertson RJ, Jaros E, Perry RH, Kelly PJ, Lunec J, Pearson ADJ (1997): Mitotic percentage index: a new prognostic factor for childhood medulloblastoma. *Eur J Cancer* 33: 609-615.

Giordana MT, Migheli A, Pavanelli E (1998): Isochromosome 17q is a constant finding in medulloblastoma. An interphase cytogenetic study on tissue sections. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24: 233-238.

Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, Scott MP (1997): Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse *patched* mutants. *Science* 277: 1109-1113.

Greenberg F, Guzzetta V, Montes de Oca-Luna R, Magenis R, Smith A, Richter S, Kondo W, Dobyns W, Patel P, Lupski J (1991): Molecular analysis of the Smith-Magenis syndrome: a possible contiguous-gene syndrome associated with del(17)(p11.2). *Am J Hum Genet* 49: 1207-1218.

Griffin CA, Hawkins AL, Packer RJ, Rorke LB, Emanuel BS (1988): Chromosome abnormalities in pediatric brain tumors. *Cancer Res* 48: 175-180.

Hamilton SR, Liu B, Parson RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B, Burger PC, Wood PA, Taqi F, Booker SV, Petersen GM, Offerhaus GJA, Tersmette AC, Giardiello FM, Vogelstein B, Kinzler KW (1995): The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 332: 839-847.

Haslam RHA, Lamborn KR, Becker LE, Israel MA (1998): Tumor cell apoptosis present at diagnosis may predict treatment outcome for patients with medulloblastoma. *J Pediatr Hematol/Oncol* 20: 520-527.

He X, Skapek SX, Wikstrand CJ, Friedman HS, Trojanowski JQ, Kemshead JT, Coakham HB, Bigner SH (1989): Phenotypic analysis of four human medulloblastomas cell lines and transplantable xenografts. *J Neuropathol* 48: 48-68.

He X, Wikstrand CJ, Friedman HS, Bigner SH (1991): Differentiation characteristics of newly established medulloblastoma cell lines (D384 Med, D425 Med, and D458 Med) and their transplantable xenografts. *Lab Invest* 64: 833-843.

Heideman RL, Packer RJ, Albright LA, Freeman CR, Rorke LB (1997): Tumors of the central nervous system. In: *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, PA Pizzo, DG Poplack, eds. Lippincott-Raven publishers, Philadelphia, p 633.

Heim S, Mandahl N, Stromblad S, Lindstrom E, Salford LG, Mitelman F (1989): Trisomy 7 and sex chromosome loss in human brain tissue. *Cytogenet Cell Genet* 52: 136-138.

Heim S, Mitelman F (1995): *Cancer Cytogenetics*. Second Edition. Wiley-Liss, Inc. NY.

Ingham PW (1998): The *patched* gene in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 8: 88-94.

Jacobsen PF, Jenkyn DJ, Papadimiriou JM (1985): Establishment of a human cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 44: 5472-5485.

James DC, He L, Carlbom E, Mikkelsen T, Ridderheim P-A, Cavenee WK, Collins VP (1990): Loss of genetic information in central nervous system tumors common to children and young adults. *Genes Chromosom Cancer* 2: 94-102.

Johansson B, Heim S, Mandahl N, Mertens F, Mitelman F (1993): Trisomy 7 in nonneoplastic cells. *Genes Chromosom Cancer* 6: 199-205.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman FM, Pinkel D (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetics analysis of solids tumors. *Sciences* 258: 761-766.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994): Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosom Cancer* 10: 231-243.

Kaplan J-C, Delpech M (1989): Biologie moléculaire et médecine. Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

Karnes PS, Tran TN, Cui MY, Raffel C, Gilles FH, Barranger JA, and Ying KL (1992): Cytogenetic analysis of 39 pediatric central nervous system tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 59: 12-19.

Kenigsberg RL, Hong Y, Yao H, Lemieux N, Michaud J, Tautu C, Theoret Y (1997): Effects of basic fibroblast growth factor on the differentiation, growth, and viability of a new human medulloblastoma cell line (UM-MB1). *Am J Pathol* 15: 867-881.

Khan J, Parsa NZ, Harada T, Meltzer PS, Carter NP (1998): Detection of gains and losses in 18 meningiomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 103: 95-100.

Kingston HM (1994): ABC of Clinical Genetics. Second Edition. BMJ Publishing Group. Printed in Great Britain by Eyre & Spottiswoode Ltd, London and Margate.

Koch A, Tonn J, Kraus JA, Sörensen N, Albrecht S, Wiestler OD, Pietsch T (1996): Molecular analysis of the lissencephaly gene 1 (*LIS-1*) in medulloblastomas. *Neuropathol App Neurobiol* 22: 233-242.

Kozmik Z, Sure U, Ruedi D, Busslinger M, Aguzzi A (1995): Absence of p53 mutations in childhood central nervous system primitive neuroectodermal tumors. *Neurosurgery* 33: 301-306.

Krajewski S, Krajewska M, Ehrmann J, Sikorska M, Lach B, Chatten J, Reed JC (1997): Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1, and Bax in tumors of central and peripheral nervous system origin. *Am J Pathol* 150: 805-814.

Krauss JA, Koch A, Albrecht S, Von Deimling A, Wiestler OD, Pietsch T (1996): Loss of heterozygosity at locus *F13B* on chromosome 1q in human medulloblastoma. *Int J Cancer* 67: 11-15.

Lam C-W, Xie J, To K-F, Ng H-K, Lee K-C, Yuen N W-F, Lim P-L, Chan LY-S, Tong S-F, McCormick F (1999): A frequent activated smoothed mutation in sporadic basal cell carcinomas. *Oncogene* 18: 833-836.

Lee SE, Johnson SP, Hale LP, Li J, Bullock N, Fuchs H, Friedman A, McLendon R, Bigner DD, Modrich P, Friedman HS (1998): Analysis of DNA mismatch repair proteins in human medulloblastoma. *Clin Cancer Res* 4: 1415-1419.

Lemieux N, Richer C-L (1989): Synchronisation of cultured retinoblastoma cells for high resolution chromosomes showing up to 1000 bands. *Cancer Genet Cytogenet* 40: 55-63.

Lemieux N, Dutrillaux B, Viegas-Péquinot E (1992): A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence *in situ* hybridization of small single-copy genes. *Cytogenet Cell Genet* 59: 311-312.

López-Ginés C, Cerdá-Nicolás M, Gil-Benson R, Barcia-Salorio J.L, Llombart-Bosch A (1997): Involvement of the long arm of chromosome 9 in medulloblastoma in an adult. *Cancer Genet Cytogenet* 96: 81-84.

Meddeb M, Danglot G, Chudoba I, Vénuat A-M, Bénard J, Avet-Loiseau H, Vasseur B, Le Paslier D, Terrier-Lacombe M-J, Hartmann O, Bernheim A (1996): Additional copies of a 25 Mb chromosomal region originating from 17q23.1-17qter are present in 90% of high-grade neuroblastomas. *Genes Chromosom Cancer* 17: 156-165.

Merzak A, Pilkington J.G (1997): Molecular and cellular pathology of intrinsic brain tumours. *Cancer Metastasis Reviews* 16: 155-177.

Mitelman F (1994): Catalog of chromosome aberrations in cancer. Fifth edition. Wiley-Liss Inc, NY.

McAllister RM, Isaacs H, Rongey R, Peer M, Au W, Soukup SW, Gardner MB (1977): Establishment of a human medulloblastoma cell line. *Int J Cancer* 20: 206-212.

McDonald JD, Daneshvar L, Willert JR, Matsumura K, Waldman F, Cogen PH (1994): Physical mapping of chromosome 17p13.3 in the region of a putative tumor suppressor gene important in medulloblastoma. *Genomics* 23: 229-232.

Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, von Deimling A, Poustka A (1997): *DMBT1*, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nature Genet* 17: 32-39.

Moore KD, Dillon-Carter O, Conejero C, Poltorak M, Chedid M, Tornatore C, Freed WJ (1996): In vitro properties of a new established medulloblastoma cell line, MCD-1. *Mol Chem Neuropathol* 29:107-126.

Moriuchi S, Shimizu K, Miyao Y, Hayakawa T (1996): An immunohistochemical analysis of medulloblastoma and PNET with emphasis on N-myc protein expression. *AntiCancer Res* 16: 2687-2692.

Moriuchi S, Shimizu K, Miyao Y, Kishima H, Okawa M, Hayakawa T (1997): Decreased N-myc expression in human medulloblastoma cell lines during differentiation. *Anticancer Res* 17: 301-306.

Muleris M, Almeida A, Dutrillaux AM, Pruchon E, Vega F, Delattre JY, Poisson M, Malfoy B, Dutrillaux B (1994a): Oncogene amplification in human gliomas: a molecular cytogenetic analysis. *Oncogene* 9: 2717-2722.

Muleris M, Almeida A, Gerbault-Seureau M, Malfoy B, Dutrillaux B (1994b): Detection of DNA amplification in 17 primary breast carcinomas with homogeneously staining regions by a modified comparative genomic hybridization technique. *Genes Chromosom Cancer* 10: 160-170.

Muleris M, Richard F, Apiou F, Dutrillaux B (1996): Hybridation *in situ* en cytogénétique moléculaire -principes et techniques- Éditions Médicales Internationales, Paris.

Neumann E, Kalousek DK, Norman MG, Steinbok P, Cochrane D, Goddard K (1993): Cytogenetic analysis of 109 pediatric central nervous system tumors. *Cancer Cytogenet* 71: 40-49.

Nicholson JC, Ross FM, Kohler JA, Ellison DW (1999): Comparative genomic hybridization and histological variation in primitive neuroectodermal tumours. *Br J Cancer* 80: 1322-1331.

Ohgaki H, Eibl R, Wiestler O, Yasargil M, Newcomb E, Kleihues P (1991): *p53* mutations in non astrocytic human brain tumors. *Cancer Res* 51: 6202-6205.

Orellana C, Hernandez-Martí M, Martínez F, Castel V, Millán JM, Alvarez-Garijo JA, Prieto F, Badía L (1998): Pediatric brain tumors: Loss of heterozygosity at 17p and TP53 gene mutations. *Cancer Genet Cytogenet* 102: 93-99.

Packer RJ, (1999): Brain tumors in children. *Arch Neurol* 56: 421-425.

Pietsch T, Scharmann T, Fonatsch C, Schmidt D, Öckler R, Freihoff D, Albrecht S, Wiestler OD, Zeltzer P, Riehm H (1994): Characterization of five new cell lines derived from human primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 54: 3278-3287.

Pietsch T, Koch A, Wiestler OD (1997): Molecular genetic studies in medulloblastoma evidence for tumor suppressor genes at the chromosomal regions 1q31-32 and 17p13. *Klin Padiatr* 209: 150-155.

Piper J, Rutovitz D, Sudar D, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1995): Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19: 10-26.

Pollack IF (1999): Pediatric brain tumors. *Seminars Surg Oncol* 16: 73-90.

Provias PJ, Becker LE (1996): Cellular and molecular pathology of medulloblastoma. *J Neuro-Oncol* 29: 35-43.

Rabbitts TH (1994): Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372: 143-149.

Raffel C, Gilles FE, Weinberg KI (1990): Reduction to homozygosity and genes amplification in central nervous system primitive neuroectodermal tumors of childhood. *Cancer Res* 50: 587-591.

Raffel C (1996): Gene therapy for PNET. *J Neuro-Oncol* 29: 113-118.

Raffel C, Jenkins RB, Frederick L, Hebrink D, Alderete B, Fults DW, James CD (1997): Sporadic medulloblastomas contain *PTCH* mutations. *Cancer Res* 57: 842-845.

Rasheed BKA, Stenzel TT, McLendon RE, Parsons R, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD, Bigner SH (1997): *PTEN* gene mutation are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res* 57: 4187-4190.

Reardon DA, Michalkiewicz E, Boyett JM, Sublett JE, Entekin RE, Ragsdale ST, Valentine MB, Behm FG, Li H, Heideman RL, Kun LE, Shapiro DN, Look AT (1997): Extensive genomic abnormalities in childhood medulloblastoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 57: 4042-4047.

Reed J, Meister L, Cuddy M, Geyer C, Pleasure D (1991): Differential expression of the *bcl-2* proto-oncogene in neuroblastomas and other human neuronal tumors. *Cancer Res* 51: 6529-6538.

Rorke LB (1983): The cerebellar medulloblastoma and its relationship to primitive neuroectodermal tumors. *J Neuropatol Exp Neurol* 42: 1-15.

Rorke LB, Packer RJ, Biegel JA (1996): Central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors of infancy and childhood: definition of an entity. *J Neurosurg* 85: 56-65.

Rorke LB, Trojanowski JQ, Lee VM-Y, Zimmerman RA, Sutton LN, Biegel JA, Goldwein JW, Packer RJ (1997): Primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Brain Pathol* 7: 765-784.

Rostomily RC, Bermingham-McDonogh O, Berger MS, Tapscott SJ, Reh TA, Olson JM (1997): Expression of neurogenic basic helix-loop-helix genes in primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 57: 3526-3531.

Rouah E, Wilson DR, Armstrong DL, Darlington GJ (1989): *N-myc* amplification and neuronal differentiation in human primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 49: 1797-1801.

Rubinstein LJ (1985): Embryonal central neuroepithelial tumors and their differentiating potential. A cytogenetic view of a complex neuro-oncological problem. *J Neurosurg* 62: 795-805.

Russo C, Pellarin M, Tingby O, Bollen AW, Lamborn KR, Mohapatra G, Collins VP, Feuerstein BG (1999): Comparative genomic hybridization in patients with supratentorial and infratentorial primitive neuroectodermal tumors. *Am Cancer Society* 86: 331-339.

Sainati L, Bolcato S, Montaldi A, Celli P, Stella M, Leszl A, Silvestro L, Perilongo G, Cordero di Montezemolo L, Basso G (1996): Cytogenetics of pediatric central nervous system tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 91: 13-27.

Sapienza C (1992): Genome imprinting and cancer genetics. *Semin Cancer Biol* 3: 151-158.

Sato K, Schäuble B, Kleihues P, Ohgaki H (1996): Infrequent alterations of the *p15*, *p16*, *CDK4* and *CYCLIN D1* genes in non-astrocytic human brain tumors. *Int J Cancer* 66: 305-308.

Sawyer JR, Swanson CM, Roloson GJ, Longee DC, Boop FA, Chadduck WM (1991): Molecular cytogenetic analysis of a medulloblastoma with isochromosome 17 and double minutes. *Cancer Genet Cytogenet* 57: 181-186.

Saylor A, Sidransky D, Friedman H, Bigner S, Bigner D, Vogelstein B, Brodeur G (1991): Infrequent *p53* mutations in medulloblastomas. *Cancer Res* 51: 4721-4723.

Scheurlen WG, Krauss J, Kühl J (1995): No preferential loss of one parental allele of chromosome 17p13.3 in childhood medulloblastoma. *Int J Cancer* 63: 372-374.

Scheurlen WG, Sorensen N, Roggendorf HS, Kuhl J (1996): Molecular analysis of medulloblastomas occurring simultaneously in monozygotic twins. *Eur J Pediatr* 155: 880-884.

Scheurlen WG, Seranski P, Mincheva A, Kühl J, Sorensen, Krauss J, Lichter P, Poustka A, Wilgenbus KK (1997): High-resolution deletion mapping of

chromosomal arm 17p in childhood primitive neuroectodermal tumors reveals a common chromosomal disruption within the Smith-Magenis region, an unstable region in chromosome band 17p11.2. *Genes Chromosom Cancer* 18: 50-58.

Scheurlen WG, Schwabe GC, Joos S, Mollenhauer J, Sörensen N, Kühl J (1998): Molecular Analysis of childhood primitive neuroectodermal tumors defines markers associated with poor outcome. *J Clin Oncol* 16: 2478-2485.

Schiffer D, Cavalla P, Migheli MT, Chiadò-Piat G, Chiadò-Piat L (1996): Bcl-2 distribution in neuroepithelial tumors: an immunohistochemical study. *J Neuro-Oncol* 27: 101-109.

Schleiermacher G, Peter M, Michon J, Hugot J-P, Vielh P, Zucker J-M, Magdelénat H, Thomas G, Delattre O (1994): Two distinct deleted regions on the short arm of chromosome 1 in neuroblastoma. *Genes Chromosom Cancer* 10: 275-281.

Schrock E, Blume C, Meffert M-C, du Manoir S, Bersch W, Kiessling M, Lozanowa T, Thiel G, Witkowski R, Ried T, Cremer T (1996): Recurrent gain of chromosome arm 7q in low-grade astrocytic tumors studied by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 15: 199-205.

Schütz BR, Scheurlen W, Krauss J, du Manoir S, Joos S, Bentz M, Lichter P (1996): Mapping of chromosomal gains and losses in primitive neuroectodermal tumors by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 16: 196-203.

Seeger RC, Brodeur GM, Asthe H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D (1985): Association of multiple copies of the *N-myc* oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Eng J Med* 313: 1111-1116.

Seranski P, Heiss NS, Dhorne-Pollet S, Radelof U, Korn B, Hennig S, Backes E, Schmidt S, Wiemann S, Schwarz CE, Lehrach H, and Poustka A (1999): Transcription mapping in a medulloblastoma breakpoint interval and Smith-Magenis syndrome candidate region: identification of a 53 transcriptional units and new candidate genes. *Genomics* 56: 1-11.

Slavc I, Rodriguez IR, Mazuruk K, Chader GJ, Biegel JA (1997): Mutation analysis and loss of heterozygosity of PEDF in central nervous system primitive neuroectodermal tumors. *Int J Cancer* 72: 277-282.

Shapiro DN, Valentine V, Eagle L, Yin X, Morris SW, Prochownik EV (1994): Assignment of the human MAD and MXI1 genes to chromosomes 2p12-p13 and 10q24-q25. *Genomics* 23: 282-285.

Smith JS, Tachibana I, Allen C, Chiappa SA, Lee HK, Melver B, Jenkins RB, Raffel C (1999): Cloning of a human ortholog (RPH3AL) of (*RNO*)*Rph3al* from a candidat 17p13.3 medulloblastoma tumor suppressor locus. *Genomics* 59: 97-101.

Smyth I, Narang MA, Evans T, Heimann C, Nakamura Y, Chenevix-Trench G, Pietsch T, Wicking C, Wainwright BJ (1999): Isolation and characterization of human *Patched 2* (*PTCH2*), a putative tumor suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. *Hum Mol Genet* 8: 291-297.

Sozzi G, Tornielli S, Tagliabue E, Sard L, Pezella F, Pastorino U, Minoletti F, Pilotti S, Ratcliffe C, Veronese ML, Goldstraw P, Huebner K, Croce CM, Pierotti MA (1997): Absence of Fhit protein in primary lung tumours and cell lines with FHIT gene abnormalities. *Cancer Res* 57: 5207-5212.

Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WKA, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DHF, Tavtigian SV (1997): Identification of a candidat tumour suppresser gene, *MMAC1*, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature Genet* 15: 356-362.

Steichen-Gersdorf E, Baumgartner M, Kreczy A, Maier H, Fink F-M (1997): Deletion mapping on chromosome 17p in medulloblastoma. *Br J Cancer* 76: 1284-1287.

Stevens, MCG, Cameron AH, Muir KR, Parkes SE, Reid H, Sklar J (1991): Descriptive epidemiology of primary central nervous system tumours in children: a population-based study. *Clin Oncol* 3: 323-329.

Stevenson L, Echlin R (1934): The nature and origine of some tumors of the cerebellum (medulloblastoma). *Arch Neurol Psychiat* 31: 93.

Strachan T, Read AP (1998): *Génétique moléculaire humaine*. Traduit de l'anglais par Nathalie Cartier-Lacave. Flammarion Médecine-Sciences, Paris

Stratton MR, Darling J, Cooper CS, Reeves BR (1991): A case of cerebellar medulloblastoma with a single chromosome abnormality. *Cancer Genet Cytogenet* 53: 101-103.

Tait DM, Eeles RA, Carter R, Ashley S, Ormerod MG (1993): Ploidy and proliferative index in medulloblastoma: useful prognostic factors? *Eur J Cancer* 29A: 1383-1387.

Tamura K, Shimizu K, Yamada M, Okamoto Y, Matsui YM, Park KC, Mabuchi E, Moriuchi S, Mogami H (1989): Expression of a major histocompatibility

complex on human medulloblastoma cells with neuronal differentiation. *Cancer Res* 49: 5380-5384.

Tenan M, Colombo BM, Pollo B, Cajola L, Broggi G, Finocchiaro G (1994): p53 mutations and microsatellite analysis of loss of heterozygosity in malignant gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 74: 139-143.

Therman E, Susman M (1993): *Human Chromosomes: Structure, Behavior, and Effects*. Third edition. Springer-Verlag, NY.

Thomas GA, Raffel C (1991): Loss of heterozygosity on 6q, 16, 17p in human central nervous system primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 51: 639-643.

Thompson MW, McInnes RR, Willard HF (1995): *Génétique Médicale*. Traduit de l'anglais par Michel Vekemans. Cinquième édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

Trojanowski JQ, Friedman HS, Burger PC, Bigner DD (1987): A rapidly dividing human medulloblastoma cell line (D283 MED) expresses all three neurofilament subunits. *Am J Pathol* 126: 358-363.

Trojanowski JQ, Tohyama T, Lee MY (1992) Medulloblastomas and related primitive neuroectodermal brain tumors of childhood recapitulate molecular milestones in maturation of neuroblasts. *Mol Chem Neuropathol* 17: 121-135.

Vagner-Capodano AM, Genter JC, Choux M, Lena G, Garbarel D, Bernard JL, Raybaud C (1989): Chromosomal abnormalities in 16 pediatric brain tumors. *Pediatr Neurosci* 14: 150-160.

Vagner-Capodano AM, Zattara-Cannoni H, Gambarelli D, Gentet JC, Genitori L, Lena G, Graziani N, Raybaud C, Choux M, and Grisoli F (1994): Detection of i(17q) chromosome by fluorescence in situ hybridization (FISH) with interphase nuclei in medulloblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 78: 1-6.

Vogan K, Bernstein M, Leclerc JM, Brisson L, Brossard J, Brodeur G, Pelletier J, Gros P (1993): Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastoma. *Cancer Res* 53: 5269-5273.

Vogel F, Motulsky AG (1997): *Human genetics: problems and approaches*. Third edition. Springer-Verlag, Germany.

von Deimling AR, Eibl RH, Ohgaki H, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Kleihues P, Chung RY, Wiestler OD, Seizinger BR (1992): p53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II and grade III astrocytoma. *Cancer Res* 52: 2987-2990.

Vorechovsky I, Tingby O, Hartman M, Stromberg B, Nister M, Collins VP, Tofgard R (1997): Somatic mutations in the human homologue of *Drosophila* patched gene in primitive neuroectodermal tumours. *Oncogene* 15: 361-366.

Vortmeyer AO, Stavrou T, Selby D, Li G, Weil RJ, Park W-S, Moon Y-W, Chandra R, Goldstein AM, Zhuang Z (1999): Deletion analysis of the adenomatous polyposis coli and *PTCH* gene loci in patients with sporadic and nevoid basal cell carcinoma syndrome-associated medulloblastoma. *Am Cancer Society* 85: 2662-2667.

Weggen S, Bayer TA, Koch A, Salewski H, Scheidtmann K-H, Pietsch T, Wiestler O (1997): Characterization of neural cell lines derived from SV40 large T-induced primitive neuroectodermal tumors. *Brain Pathol* 7: 731-739.

Weller M, Schuster M, Pietsch T, Schabet M (1998): CD95 ligand-induced apoptosis of human medulloblastoma cells. *Cancer Letters* 128: 121-126.

Wu W, Kemp BL, Proctor ML, Gazdar AF, Minna JD, Hong WK, Mao L (1999): Expression of *DMBT1*, a candidate tumor suppressor gene, is frequently lost in lung cancer. *Cancer Res* 59: 1846-1851.

Xiao GH, Jin F, Klein-Szanto AJ, Goodrow TL, Linehan MW, Yeung RS (1997): The FHIT gene product is highly expressed in the cytoplasm of renal tumular epithelium and is down-regulated in kidney cancers. *Am J Pathol* 151: 1541-1547.

Yasue M, Tomita T, Engelhard H, Gonzalez-Crussi F, McLone DG, Bauer KD (1989): Prognostic importance of DNA ploidy in medulloblastoma of childhood. *J Neurosurg* 70: 385-391.

Zerbini C, Gelber RD, Weinberg D, Sallan SE, Barnes P, Kupsky W, Scott RM, Tarbell NJ (1993): Prognostic factors in medulloblastoma, including DNA ploidy. *J Clin Oncol* 11: 616-622.

Zhuang Z, Park W-S, Pack S, Schmidt L, Vortmeyer AO, Pak E, Pham T, Weil RJ, Candidus S, Lubensky IA, Linehan WM, Zbar B, Weirich G (1998): Trisomy 7-harboring non-random duplication of the mutant *MET* allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 20: 66-69.

7. ANNEXE

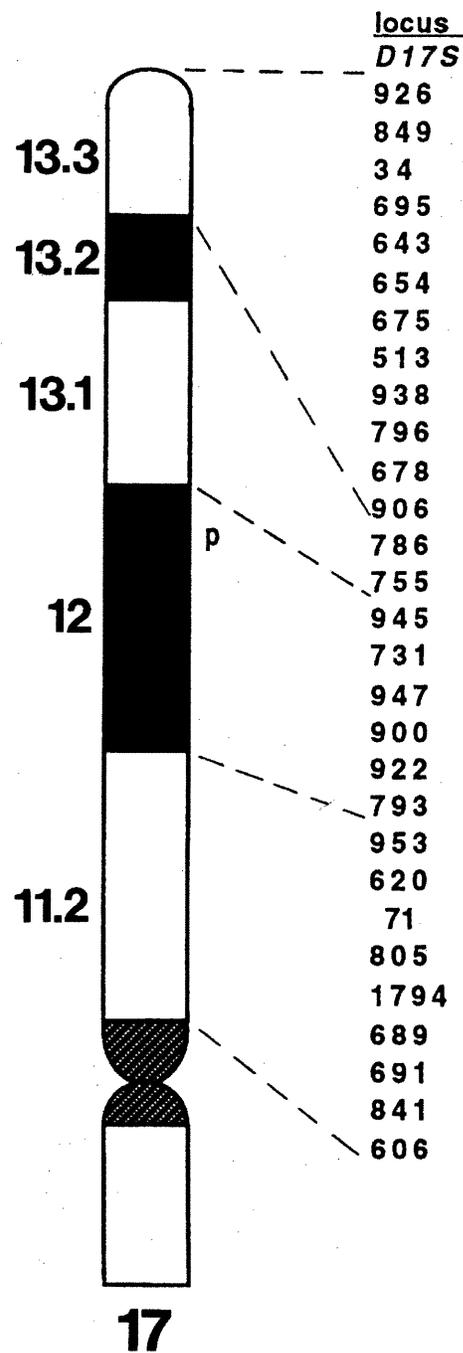


Figure 1. Idiogramme en bandes-G du bras court du chromosome 17 humain et localisation de ces locus chromosomiques. D'après Scheurlen *et al.*, 1997.