

Université de Montréal

**Mécanismes moléculaires sous-jacents au développement du  
médulloblastome**

Par

Frédéric Racicot, M.D.

Département de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de maîtrise en biologie moléculaire

Août 2023

©Frédéric Racicot, 2023



Université de Montréal  
Département de biologie moléculaire, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé  
**Mécanismes moléculaires sous-jacents au développement du  
médulloblastome**

Présenté par  
Frédéric Racicot, M.D.

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

**Dr Przemyslaw Mike Sapiha**

Président-rapporteur

**Dr Frédéric Charron**

Directeur de recherche

**Dr Sébastien Perreault**

Membre du jury



## Résumé

Le médulloblastome est une des tumeurs les plus fréquentes du système nerveux central chez l'enfant. Son impact clinique, ainsi que les effets secondaires engendrés par les traitements actuels, sont significatifs en matière de morbidité et de mortalité. La caractérisation moléculaire des tumeurs du système nerveux central a grandement évolué, et ce, particulièrement en ce qui concerne le médulloblastome. Des travaux antérieurs ont permis d'établir qu'un des sous-groupes de médulloblastome est caractérisé par l'activation de la voie sonic hedgehog. La mutation la plus fréquente menant à ce sous-type de médulloblastome est la mutation du gène suppresseur de tumeur *PTCH1*. Grâce au modèle de souris *Ptch1<sup>+/-</sup>*, des données issues de notre laboratoire ont permis de caractériser le développement de cette tumeur comme étant en deux étapes. Ce travail porte sur la caractérisation du mécanisme par lequel cette première étape, soit la perte d'hétérozygotie de *Ptch1*, survient.

Tout d'abord, nous revisitons le rôle *in vivo* du corécepteur Boc dans la tumorigénèse. Selon nos résultats, la modulation de *Boc* ne semble pas avoir un impact significatif sur le développement tumoral dans des expériences de transplantation orthotopiques. Ensuite, nous démontrons que le ligand Shh augmente le dommage à l'ADN, ce qui mène à une hausse des évènements de recombinaisons qui peuvent causer une perte d'hétérozygotie. Nous tentons de moduler l'activité de Rad51 en observant une tendance non statistiquement significative des évènements de recombinaison avec des inhibiteurs de Rad51. Nous démontrons ensuite qu'un inhibiteur de Cdc7 permet la diminution des évènements de recombinaisons ainsi qu'une diminution du stress répliatif de l'ADN. En intervenant sur le gène *Mcm2* grâce à un modèle de souris transgénique, nous parvenons à prouver

qu'une diminution de l'action de *Mcm2* permet une diminution du stress répliatif de l'ADN.

En somme, la première étape du développement du médulloblastome sonic hedgehog-activé est la perte d'hétérozygotie de *Ptch1*. Celle-ci est caractérisée par une augmentation du dommage à l'ADN engendrant une hausse des événements de recombinaison. Plusieurs cibles potentielles de modulation s'avèrent prometteuses pour un éventuel traitement ciblé.

**Mots clés :** médulloblastome, cervelet, cancer pédiatrique, sonic hedgehog, souris, Syndrome de Gorlin, neuro-oncologie, recombinaison homologue, dommage à l'ADN, perte d'hétérozygotie.

## Abstract

Medulloblastoma is one of the most common central nervous system tumors of the child. Its clinical impact, as well as the adverse effects caused by current treatments, are significant in terms of morbidity and mortality. The molecular characterization of tumors of the central nervous system has greatly evolved, particularly in the case of medulloblastoma. Previous work has established that one of the medulloblastoma subgroups is characterized by the activation of the sonic hedgehog (Shh) pathway. The most common mutation leading to this medulloblastoma subtype is the *PTCH1* tumor suppressor gene mutation. Working with the *Ptch1*<sup>+/-</sup> mouse model, data from our laboratory characterized the medulloblastoma tumorigenesis as a two-step process. This work focuses on the characterization of the mechanism by which this first step, the loss of heterozygosity of *Ptch1*, occurs.

First, we revisit the *in vivo* role of the Boc coreceptor in the medulloblastoma tumorigenesis. According to our results, *Boc* modulation does not seem to have a significant impact on tumor development. Next, we show that the Shh ligand increases DNA damage. This leads to an increase in recombination events which predispose to loss of heterozygosity. We attempt to modulate Rad51 activity and observe a non-statistically significant trend to decrease recombination events with Rad51 inhibitors. We then demonstrate that Cdc7 inhibition reduces recombination events as well as DNA replicative stress. Using an *Mcm2* transgenic mouse model, we demonstrate that a reduction in the action of *Mcm2* reduces DNA replicative stress.

To conclude, the first step in the development of Shh-activated medulloblastoma is the loss of heterozygosity of *Ptch1*. This is characterized by an increase in DNA damage leading to an increase in recombination events. Several potential modulation targets hold promise for possible targeted therapy.

**Keywords** : medulloblastoma, cerebellum, pediatric cancer, sonic hedgehog, mouse, Gorlin Syndrome, neuro-oncology, homologous recombination, DNA damage, loss of heterozygosity.



# Table des matières

Résumé .....	5
Abstract .....	7
Table des matières.....	9
Liste de figures.....	11
Liste des sigles et abréviations .....	13
Remerciements.....	17
Chapitre 1 – Introduction .....	21
L'ère moléculaire dans la classification des tumeurs du système nerveux central.....	21
Le médulloblastome : la présentation clinique .....	21
Le médulloblastome : les traitements actuels .....	22
Le médulloblastome : l'ère moléculaire.....	23
Hedgehog : la voie de signalisation responsable de la pathogenèse .....	24
De la cellule d'origine à la tumeur maligne.....	25
Chapitre 2 – Projet de recherche.....	29
Chapitre 3 – Méthodologie.....	31
Éthique .....	31
Colonies de souris .....	31
Analyses statistiques .....	32
Dissociation des GCPs et culture cellulaire .....	32
Histologie .....	33
Immunofluorescence .....	33

Transplantations orthotopiques et analyse de survie.....	34
Peignage de l'ADN ( <i>DNA combing</i> ) .....	34
Préparation des métaphases .....	35
Échange de chromatides sœurs .....	35
<b>Chapitre 4 – Résultats.....</b>	<b>37</b>
Facteurs influençant le dommage à l'ADN des GCPs.....	37
L'impact de la localisation hémisphérique dans le cervelet et du corécepteur Boc sur le dommage à l'ADN .....	37
L'impact du corécepteur Boc dans la tumorigenèse.....	39
La perte d'hétérozygotie de <i>Ptch1</i> et les évènements de recombinaison .....	42
L'impact de Shh sur les évènements de recombinaison .....	42
La recombinaison comme mécanisme de LOH de <i>Ptch1</i> et RAD51 comme cible potentielle .....	44
L'impact de l'inhibition de RAD51 sur les évènements de recombinaison .....	48
L'inhibition de <i>Cdc7</i> et son impact sur la réplication de l'ADN .....	50
L'impact du gène <i>Mcm2</i> sur la réplication de l'ADN .....	54
<b>Chapitre 5 – Discussion.....</b>	<b>57</b>
<b>Chapitre 6 – Conclusion .....</b>	<b>61</b>
Références bibliographiques .....	63

## Liste de figures

Figure 1. Voie de signalisation hedgehog chez la souris.....	25
Figure 2. De la GCP à la tumeur maligne : processus en deux étapes .....	27
Figure 3. Impact du corécepteur Boc sur le dommage à l'ADN .....	39
Figure 4. Impact du gène Boc sur l'oncogénicité des GCPs Ptch1 <sup>+/-</sup> .....	41
Figure 5. Évènements de recombinaison marqués par la construction RaDR-GFP .....	43
Figure 6. Perte d'hétérozygotie en nombre de copies neutres .....	46
Figure 7. L'expression de RAD51 chez les médulloblastomes humains.....	47
Figure 8. Échanges de chromatides sœurs avec modulation de Rad51 .....	49
Figure 9. Technique de peignage de l'ADN sur des GCPs dissociées .....	52
Figure 10. Peignage de l'ADN chez des GCPs exposées à un inhibiteur de Cdc7.....	53
Figure 11. Peignage de l'ADN chez des GCPs selon leur statut Mcm2 .....	54



## Liste des sigles et abréviations

GCP	Cellule granulaire précurseure
MB	Médulloblastome
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
Shh	Sonic hedgehog
SHH-MB	Médulloblastome de type SHH-activé
SHH $\alpha$ -MB	Médulloblastome de type SHH-activé, sous-groupe alpha
SHH $\beta$ -MB	Médulloblastome de type SHH-activé, sous-groupe bêta
SHH $\delta$ -MB	Médulloblastome de type SHH-activé, sous-groupe delta
SHH $\gamma$ -MB	Médulloblastome de type SHH-activé, sous-groupe gamma
SNC	Système nerveux central
EGL	Couche granulaire externe
IGL	Couche granulaire interne
LOH	Perte d'hétérozygotie
HR	Recombinaison homologue
SSA	Réparation par appariement entre molécules d'ADN simple brin
NHEJ	Jonction d'extrémités non homologues
BIR	Réplication induite par une cassure

SDSA	Réparation par appariement entre molécules d'ADN simple brin dépendante de la synthèse
PBS	Tampon phosphate salin
PFA	Paraformaldéhyde
PDL	Poly-D-lysine
siRNA	Petits ARN interférents

*À mes parents, Caroline Maamari et Pierre Racicot*

*mon frère, Jean-Nicolas Racicot*

*ma femme, Stéphanie Parisien-La Salle*

*et mes fils, Louis et Paul Racicot*





## Remerciements

J'aimerais d'abord remercier Dr Frédéric Charron, mon directeur de recherche. Il m'a donné la chance d'être introduit au monde des sciences fondamentales et de la biologie moléculaire alors qu'ayant suivi une formation clinique, je n'avais pas reçu de formation formelle en laboratoire. Le contact avec le laboratoire est primordial pour acquérir une compréhension plus complète de la pathophysiologie et du traitement des pathologies oncologiques. Grâce à l'accompagnement du Dr Charron, nous avons réussi à naviguer à travers les défis qui venaient avec le fait de continuer la clinique parallèlement à mon temps de recherche.

J'aimerais ensuite remercier Dr Lukas Tamayo-Orrego, mon superviseur et collègue du laboratoire Charron qui m'a pris sous son aile et m'a pratiquement tout appris ce que je sais au laboratoire. Je n'aurais pas pu effectuer ce travail sans lui et je lui en serai toujours reconnaissant. Son parcours est plus qu'impressionnant et il constitue un modèle de savoir et de pensée scientifique pour moi et plusieurs autres.

J'aimerais remercier les membres de mon comité d'évaluation de mémoire, soit Dr Sébastien Perreault et Dr Przemyslaw Mike Sapieha.

Je remercie les Dre Catherine Larochelle, Dr Dang K. Nguyen et Dr Jacques Lacroix pour leur supervision en tant que directeurs du Programme de formations de cliniciens-chercheurs.

Je remercie aussi les Dr David Hipfner et Dr Hugo Wurtele pour leurs conseils lors du comité de suivi.

J'aimerais aussi remercier quelques neurochirurgiens associés à l'Université de Montréal : Dr Mathieu Laroche, mon ancien directeur de programme en neurochirurgie qui m'a grandement soutenu et aidé à me développer dans cet axe de recherche malgré les exigences cliniques; Dr. Alexander G. Weil qui a toujours été présent et a toujours été disponible pour me prodiguer des conseils tout au long du parcours; Dre Marie-Pierre Fournier-Gosselin, ma directrice de programme actuelle.

J'aimerais remercier tous mes collègues du Laboratoire Charron qui m'ont soutenu lors de mon passage au laboratoire : Dre Patricia Yam, Dre Sabrina Schlienger, Dre Shannon Swikert, Sushmeta Mohan, Heather Keightly, Dre Sara Calabretta, Dre Chia-Lun Wu, Dr Julien Ferent, Nursen Balekoglu, Rachelle Sauvé, François Depault, Jean-François Michaud, Samer Salameh et Dre Amandine Bemmo.

Je remercie le personnel de l'IRCM pour leur aide et leur disponibilité : Dr Dominic Filion, Dr Ovidiu Jumanca, Jessica Barthe, Marie-Anne R. Jacob, Caroline Dubé, Sara Demontigny, Valérie Darisse-Lafrance.

Je remercie l'Université de Montréal, le Programme de biologie moléculaire de l'Université de Montréal, la Faculté de médecine de l'Université de Montréal, l'IRCM et le Programme de formation en neurochirurgie de l'Université de Montréal. Je remercie aussi les IRSC et les FRQS pour leur appui et leur financement pour ce projet de recherche.

Je remercie grandement les Champions de l'érudition, le BBWC et mes amis qui ont toujours été là pour moi et qui continuent à l'être.

Je remercie Claudie Therrien, la conjointe de mon frère, leur fils/mon neveu, Arthur Racicot et leur fille/ma nièce, Florence Racicot. Je remercie Vera Maamari, Sami Maamari, Cécile Taube et Henry Taube. Je remercie Fadi Maamari, Riad Maamari, Sylvie Racicot et Chantal Noble. Je remercie Louise-Marie Parisien, Benoit La Salle, Manon Gohier, Jean-Christophe Parisien-La Salle, Marie-Julie Parisien-La Salle, Maxime Parisien-La Salle et leurs compagnes et enfants qui constituent ma deuxième famille. Je remercie Merlot qui est toujours présente pour toute la famille.

Finalement, je dédie ce mémoire à mes parents, Caroline Maamari et Pierre Racicot, qui m'ont guidé tout au long de la vie et m'ont toujours appuyé dans mes projets. À mon frère, Jean-Nicolas Racicot, que j'ai toujours suivi avec admiration et qui est et sera toujours là pour moi. À ma femme, Stéphanie Parisien-La Salle, qui est l'amour de ma vie, ma meilleure amie et dont la présence, les actions et le soutien sont inestimables. À mon fils, Louis Racicot, qui me surprend chaque jour, qui est mon rayon de soleil et de qui je suis tellement fier. À mon fils, Paul Racicot, le petit nouveau qui m'apporte déjà tellement de bonheur et de qui je suis aussi déjà tellement fier. Je vous aime.



# Chapitre 1 – Introduction

## **L'ère moléculaire dans la classification des tumeurs du système nerveux central**

Notre compréhension des tumeurs du système nerveux central a évolué de manière sans précédent dans la dernière décennie. Notre compréhension de la pathophysiologie menant à leur développement s'est approfondie de façon exponentielle. Ces avancées, notamment sur le plan de la compréhension des modulations des voies de signalisation, ont mené à de grands changements dans la façon de diagnostiquer ces néoplasies, ainsi qu'à des implications cliniques de leur caractérisation moléculaire. En effet, pour la première fois en 2016, la révision de la 4<sup>e</sup> édition de la classification des tumeurs du système nerveux central de l'OMS incluait dans le diagnostic des critères moléculaires stricts (1). Cinq années plus tard, ce mouvement s'est poursuivi avec une croissance considérable de la place de la biologie moléculaire des tumeurs dans la 5<sup>e</sup> édition de la classification (2, 3). Cette caractérisation moléculaire surpasse maintenant définitivement l'aspect histologique et cytologique qui constituait historiquement l'étalon-or du diagnostic.

## **Le médulloblastome : la présentation clinique**

Le médulloblastome s'inscrit particulièrement dans cette mouvance. Dans ce contexte et en raison de son impact sociétal significatif, cette tumeur de la fosse postérieure constitue un sujet d'étude fascinant et extrêmement important. En effet, le médulloblastome représente la deuxième plus fréquente tumeur maligne du SNC chez l'enfant, suivant de près les lésions gliales (2, 4). Cette tumeur touche principalement les enfants et les jeunes adultes. Les patients chez qui cette tumeur est découverte se présentent généralement avec des symptômes d'hypertension intracrânienne liée à un effet de masse significatif dans la fosse postérieure, ainsi qu'à une hydrocéphalie obstructive engendrant une

hypertension intracrânienne supratentorielle. De plus, les patients présentent souvent un syndrome cérébelleux, ainsi qu'une atteinte neurologique liée à la compression du tronc cérébral. Cette présentation clinique nécessite bien souvent une prise en charge rapide, voire urgente, en raison d'un risque significatif de déficit neurologique et de décès.

### **Le médulloblastome : les traitements actuels**

Les traitements actuels consistent à combiner la chirurgie d'exérèse, la radiothérapie craniospinale et la chimiothérapie. L'objectif chirurgical est l'exérèse la plus complète possible de la tumeur macroscopique. Ceci vient avec un équilibre fin entre un contrôle local et oncologique par une exérèse extensive d'un côté, et un risque de déficit neurologique significatif plus la résection est agressive de l'autre côté. À noter la potentielle nécessité de procéder à une deuxième intervention pour traiter l'hydrocéphalie obstructive, soit une dérivation ventriculo-externe (traitement temporaire pendant l'épisode aigu), une dérivation ventriculo-péritonéale (ou autre type de dérivation ventriculaire permanente) ou une ventriculostomie du troisième ventricule par ventriculoscopie. Le risque engendré par la chirurgie est majoritairement considéré comme un risque immédiat, c'est-à-dire que le patient subira les effets secondaires immédiatement, ou rapidement après l'acte chirurgical. Les traitements adjuvants comprennent la chimiothérapie et la radiothérapie craniospinale. Malgré une certaine efficacité thérapeutique, ces traitements comportent un risque immédiat significatif (par la chirurgie), ainsi qu'une toxicité à long terme dévastatrice. C'est particulièrement le cas pour la radiothérapie qui entraîne des effets secondaires permanents significatifs comprenant des troubles neurocognitifs et des désordres endocriniens (5). Pour cette raison, la recherche de nouveaux traitements plus efficaces et à risques réduits s'avère primordiale. En effet, ceux-ci pourraient permettre de diminuer le risque immédiat lié à la chirurgie si une exérèse moins agressive devenait acceptable, ainsi que de diminuer les effets secondaires à long terme de radiothérapie à haute dose.

## Le médulloblastome : l'ère moléculaire

Les mécanismes moléculaires entraînant le développement du médulloblastome soulèvent l'intérêt de la communauté scientifique depuis plusieurs années. En effet, une meilleure compréhension de ces mécanismes stimule l'espoir de trouver des traitements systémiques ciblés, sécuritaires et efficaces. Depuis 2016, la classification de l'OMS des médulloblastomes comprend quatre sous-groupes moléculaires : WNT-activé, SHH-activé, groupe 3 et groupe 4 (1). Ces sous-groupes avaient été identifiés et utilisés surtout à des fins de recherches quelques années plus tôt (6). Tout récemment, la plus récente édition de la classification de l'OMS a épuré la classification en 3 sous-groupes : WNT-activé, SHH-activé et non-WNT/non-SHH. Les tumeurs SHH-activés sont séparées en *TP53*-mutant et *TP53*-wildtype (2, 3). Le médulloblastome est considéré comme une tumeur de grade 4 de l'OMS, le grade le plus élevé.

Les SHH-MBs constituent approximativement 20 % des médulloblastomes (2). Une étude récente réalisée par Cavalli *et al.* divise les SHH-MBs en 4 sous-groupes plus précis : SHH  $\alpha$ , SHH  $\beta$ , SHH  $\delta$ , and SHH  $\gamma$  (7). Ces sous-groupes, bien que considérés comme provisoires par l'OMS, sont rapportés sous une autre nomenclature dans la dernière version de la classification de l'OMS : SHH-1 (SHH  $\beta$ ), SHH-2 (SHH  $\delta$ ), SHH-3 (SHH  $\alpha$ ) et SHH-4 (SHH  $\delta$ ) (2). Dans cet ouvrage, il sera question du sous-groupe de médulloblastome SHH-3 (SHH  $\alpha$ ). La signature moléculaire de ce sous-groupe comprend : amplification *MYCN*, amplification *GLI2*, amplification *YAP1*, perte 9q, perte 10q, perte 17p (7). Ce sous-type est particulièrement susceptible de connaître une mutation *TP53* qui assombrit le pronostic. Une perte 9q est associée à l'atteinte du gène *PTCH1* (9q22). Il est à noter que des mutations germinales peuvent être à l'origine du développement de ce sous-type de médulloblastome. En effet, le syndrome du Gorlin présentant une mutation dans le gène *PTCH1*, gène codant pour le récepteur à la protéine SHH, augmente le risque de SHH-MB. En effet, 1-2% des patients avec variant pathogénique germinale pour *PTCH1* vont développer un médulloblastome (2). De plus, un syndrome de Li-Fraumeni peut engendrer une

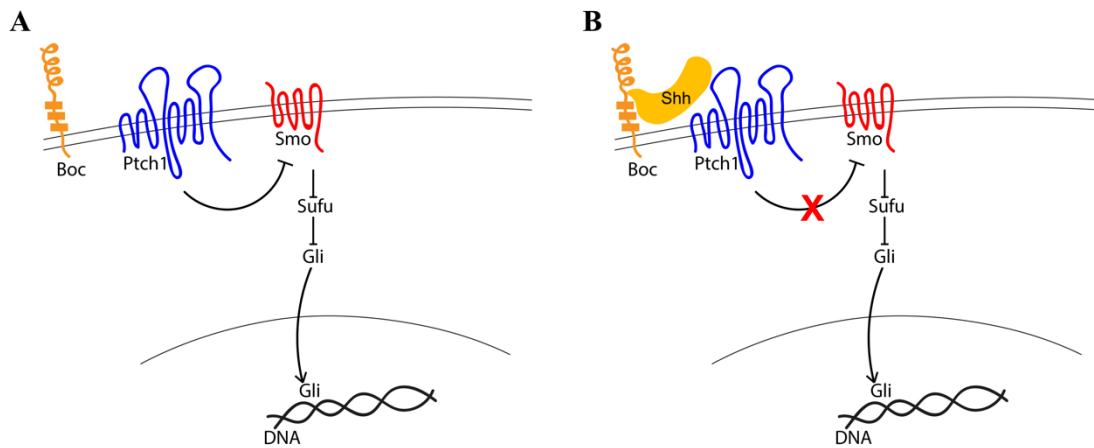
augmentation du risque de SHH-MB *TP53* mutant (2). Le pronostic associé à cette tumeur est hétérogène, avec une survie globale à 10 ans de 77% chez les nourrissons, 51% chez les enfants et 34 % chez les adultes (8).

Ce sous-groupe comporte la particularité d'affecter soit les enfants ou les jeunes adultes, d'affecter légèrement plus le sexe masculin («ratio M :F d'environ 1,5 :1 » (2)) et de présenter un risque de présentation métastatique. La cellule d'origine de cette tumeur provient du cervelet et est la cellule granulaire précurseure (GCP) (2).

### **Hedgehog : la voie de signalisation responsable de la pathogenèse**

Le cortex cérébelleux est séparé en différentes couches cellulaires, soit la couche granulaire externe, la couche moléculaire, la couche de cellules de Purkinje et la couche granulaire interne (de la couche la plus externe à la couche la plus interne). Le ligand Sonic hedgehog (Shh) sécrété par les cellules de Purkinje induit la prolifération des GCPs, cellules d'origine du médulloblastome, situées dans l'EGL. En effet, Shh vient se lier au récepteur transmembranaire Ptch1 et un corécepteur, permettant ainsi de bloquer l'inhibition de Smo, ce qui active alors la voie de signalisation menant à la prolifération des GCPs (Figure 1). À la suite de cette prolifération, les GCPs migrent vers l'IGL pour se différencier en cellules granulaires. Chez la souris, modèle animal utilisé dans cet ouvrage, ce phénomène se produit dans les dernières semaines de l'embryogenèse jusqu'à la période post-natale précoce (9, 10).





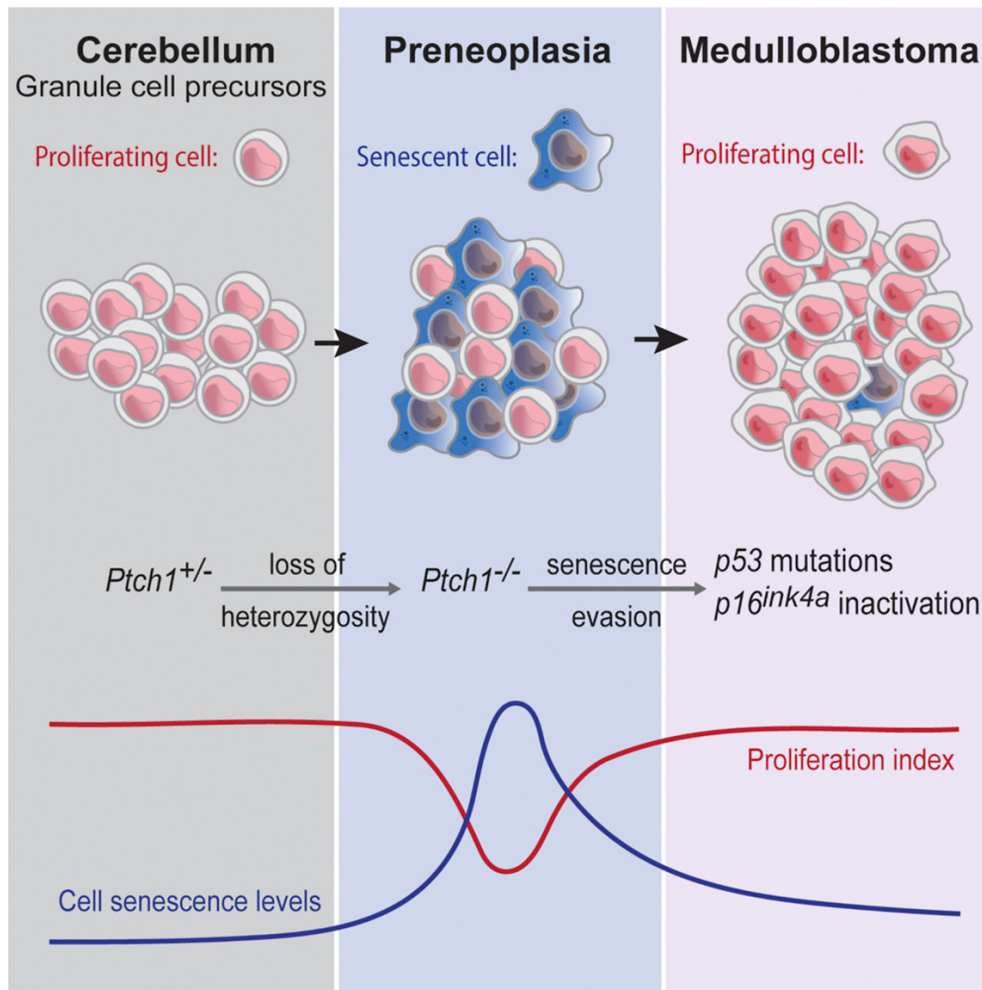
**Figure 1. Voie de signalisation hedgehog chez la souris.**

(A) Le récepteur murin transmembranaire Ptch1 exerce une inhibition sur Smo, inhibant ainsi la voie de signalisation. (B) Le ligand Shh sécrété par les cellules de Purkinje vient se lier au récepteur Ptch1 et à son corécepteur Boc (Boc étant ici illustré, mais deux autres récepteurs sont décrits pour le même ligand dans cette voie de signalisation, soit Cdon et Gas1 (9, 11, 12)), bloquant ainsi l'inhibition qu'exerce Ptch1 sur Smo et permettant l'activation de la voie de signalisation et la transcription de Gli.

### De la cellule d'origine à la tumeur maligne

Le modèle animal utilisé dans cet ouvrage est la souris *Ptch1*<sup>+/-</sup>. Ce modèle a grandement été utilisé dans l'étude du médulloblastome (13). Notre compréhension du développement du médulloblastome menant d'une GCP, cellule d'origine, à une cellule maligne s'est grandement raffinée au cours des dernières années. Il avait été avancé que ce processus s'effectuait en deux étapes (modèle de type « two-hit »). D'abord, la mutation germinale

de *Ptch1*<sup>+/-</sup> menait au développement de préneoplasies. Ensuite, la perte d'hétérozygotie (LOH) de *Ptch1*<sup>+/-</sup> permettait d'évoluer vers une cellule maligne (14, 15). Des données publiées par notre laboratoire ont permis de mieux caractériser ce processus en deux étapes. En fait, la LOH de *Ptch1*<sup>+/-</sup> mène au développement de préneoplasies visualisées chez les souris à deux semaines de vie (16), soit la première étape du processus. Sans autre mutation additionnelle, ces cellules préneoplasiques évoluent vers la sénescence cellulaire, constituant ainsi un mécanisme de suppression tumorale. C'est un exemple du phénomène nommé sénescence cellulaire induite par un oncogène. Ensuite, l'acquisition d'une seconde mutation, soit une mutation *p53* ou une inactivation *p16*<sup>ink4a</sup>, peut permettre à la cellule d'éviter la sénescence et d'évoluer vers une cellule néoplasique, menant ainsi au développement d'un médulloblastome (16, 17), deuxième étape du processus.



**Figure 2. De la GCP à la tumeur maligne : processus en deux étapes**

\*Figure provenant de Tamayo-Orrego *et al.* (16)

Le développement du médulloblastome est un processus en deux étapes. D'abord, la perte d'hétérozygotie du gène  $Ptch1^{+/-}$  mène au développement de préneoplasies. Sans mutation additionnelle, ces cellules préneoplasiques entrent en sénescence cellulaire et arrêtent de proliférer. C'est ce qu'on appelle la sénescence cellulaire induite par un oncogène. Une mutation additionnelle de  $p53$  ou l'inactivation de  $p16^{ink4a}$  permet aux

cellules prénéoplasiques d'éviter la sénescence, de proliférer, d'acquérir des caractéristiques malignes et de former un médulloblastome (16).

## Chapitre 2 – Projet de recherche

Les travaux présentés dans cet ouvrage cherchent à poursuivre la caractérisation des mécanismes moléculaires sous-jacents au développement du médulloblastome. Nous nous concentrerons ici sur la première étape de la transformation maligne de la GCP, soit la LOH de *Ptch1*<sup>+/-</sup>. Bien que nous connaissions sa nécessité pour parvenir au développement de préneoplasies, le mécanisme par lequel la LOH de *Ptch1*<sup>+/-</sup> est acquis restait incertain jusqu'à la toute récente publication de notre laboratoire à laquelle j'ai participé, celle-ci ayant permis de mieux caractériser ce processus (18).

Comme mentionné plus haut, le ligand Shh sécrété par les cellules de Purkinje permet la prolifération des GCPs, processus impliqué dans la physiologie normale du développement du cervelet (10). Toutefois, une activation trop importante de la voie de signalisation hedgehog mènera à un stress lié à la réplication de l'ADN, une instabilité génomique, ainsi qu'une augmentation des cassures double brin de l'ADN (18). Ce dommage à l'ADN peut généralement être réparé par trois processus physiologiques : la réparation par appariement entre molécules d'ADN simple brin (SSA), la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) et la recombinaison homologue (HR) (19, 20). La HR est généralement la voie préférentielle puisqu'en utilisant un brin d'ADN homologue ou une chromatide sœur comme gabarit de réparation, elle induit beaucoup moins d'erreurs dans son processus de réparation. Toutefois, elle peut mener à des événements de recombinaisons. Le fait d'établir que la LOH de *Ptch1*<sup>+/-</sup> correspondait dans une grande proportion des cas à une LOH avec nombre de copies neutres (25 % chez l'humain et 82 % chez la souris (18)) nous a suggéré que le processus de HR est central dans l'évènement initiateur de la transformation tumorale des GCPs, soit la perte de LOH de *Ptch1*<sup>+/-</sup>.

Les travaux de cet ouvrage permettent une meilleure caractérisation de cette étape cruciale de la tumorigenèse en caractérisant davantage le dommage à l'ADN chez les GCPs. Il sera d'abord question de l'impact de la latéralisation au niveau du cervelet dans le dommage à l'ADN des GCPs, soit la différence entre le dommage au niveau du vermis par rapport aux hémisphères. L'impact du corécepteur Boc sera aussi exploré. Par la suite, nous aborderons l'influence de Shh sur le dommage à l'ADN et les événements de recombinaison. Nous poursuivrons en regardant l'impact de la modulation de Rad51, protéine clef de la HR, dans les événements de recombinaison. Finalement, nous explorerons l'impact de Mcm2 sur le stress de réplication et, de façon plus indirecte, sur les événements de recombinaison.

## Chapitre 3 – Méthodologie

### Éthique

Toutes les expériences sur des souris suivent les recommandations du Conseil canadien de protection des animaux. Le protocole d'utilisation des animaux FC2016-03 a été approuvé par le Comité de protection des animaux de l'Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM).

### Colonies de souris

Souris C57 :

Une lignée de souris C57B/6 Elite obtenue de *The Jackson Laboratory* a été utilisée pour nos souris WT et dans les différents croisements murins.

Souris *Ptch1* :

Une lignée de souris *Ptch1-LacZ* (*Ptch1<sup>tm1Mps</sup>*, Cat 003081) fournie par *The Jackson Laboratory* a été utilisée comme allèle inactivé du gène *Ptch1*. Les souris hétérozygotes pour ce gène (*Ptch1<sup>+/-</sup>*) ont été grandement étudiées dans la littérature et dans notre laboratoire en tant que modèles de médulloblastome.

Souris *Boc* :

La lignée de souris mutantes pour le gène *Boc* générée par notre laboratoire a été développée et décrite précédemment par Okada *et al.* (21).

Souris *Mcm2* :

La lignée de souris *Mcm2* hypomorphiques portant l'allèle *Mcm2<sup>IRES-CreERT2</sup>* a été décrite et générée par Pruitt *et al.* (22). Les souris hétérozygotes pour cet allèle sont nommées *Mcm2<sup>+/-</sup>* dans cet ouvrage.

Souris *RaDR-GFP* :

La lignée de souris *RaDR-GFP* contient l'allèle *Rosa26 Direct Repeat-GFP (RaDR-GFP)* et a été développée dans le laboratoire de Dr Engelward (*Massachusetts Institute of Technology*) (23). Les cellules provenant de ces souris sont non fluorescentes. Toutefois, dans le cas d'un évènement de recombinaison au sein de l'allèle en question, les cellules vont devenir fluorescentes par la production de GFP.

### **Analyses statistiques**

Les informations sur les tests statistiques utilisés sont présentées dans le texte ou dans les figures. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant Prism (GraphPad), R ou SPSS Statistics. Le test de logrank a été utilisé pour évaluer la significativité statistique des analyses de survie démontrée par des courbes Kaplan-Meier.

### **Dissociation des GCPs et culture cellulaire**

Le protocole de dissociation des GCPs a été précédemment publié (9) et est un protocole modifié d'un protocole précédemment décrit dans la littérature (24). Le cervelet de souris âgées de P5-P7 a été disséqué, coupé en petits morceaux et traité avec de la trypsine 0,25 % et de la DNase1. Les échantillons passent ensuite à travers une phase de trituration. Les cellules dissociées sont ensuite centrifugées à travers un gradient de Percoll de 30 % à 65 %. Les GCPs présentes et dissociées à l'interphase du gradient sont alors prélevées et cultivées dans un milieu de Neurobasal sans sérum, avec supplémentation de B27, GlutaMAX, pyruvate de sodium et pénicilline/streptomycine. Les GCPs sont cultivées en présence de Shh 10 nM dans des plats de 24-puits avec une concentration de  $2 \times 10^5$  cellules/puit.



## **Histologie**

Les souris ont été anesthésiées avec un mélange de kétamine et xylazine et perfusées avec une solution saline et une solution tampon paraformaldéhyde (PFA) 4 % phosphate 0,12M. Les cerveaux ont été disséqués et fixés au cours de la nuit dans du PFA 4 %. Les cervelets ont été cryopréservés dans du sucrose, et congelés dans l'OCT (Tissue Tek). Des cryosections de 12 µm ont été réalisées pour les immunofluorescences.

## **Immunofluorescence**

Le protocole d'immunofluorescence a été réalisé tel que déjà publié par notre laboratoire (9, 12, 16, 18). Les GCPs dissociées ont été fixées dans du PFA 4 % pour 15 minutes. Les anticorps utilisés sont : chèvre anti-Boc (1:100, R&D), rat anti-BrdU (Abcam; ab6326; 1:2,000), anti-γ-H2AX-AF647 (Biolegend; 613408; 1:200), anti-Mcm2 (Abcam; ab4461; 1:2,000), anti-Rad51 (Abcam; ab133534; 1:1,000), lapin anti-GFP (1:1000, Invitrogen), souris anti-Ki67 antibody (1:100, Becton-Dickinson). Avant de réaliser l'immunocoloration avec l'anticorps anti-Boc, un processus de récupération antigénique (« antigen retrieval ») sur les cryosections a été réalisé dans une solution tampon de citrate de sodium à 98°C pendant 1h, suivi d'un refroidissement de 20 minutes à température pièce et d'un lavage au PBS. Avant de réaliser l'immunocoloration avec l'anticorps anti-Rad51, un processus de récupération antigénique (« antigen retrieval ») a été réalisé dans une solution tampon de citrate de sodium à 98°C pendant 15 minutes (10mM de citrate de sodium (pH 6,0) et Tween 20) avant l'étape de blocage. Tous les anticorps secondaires ont été utilisés avec une dilution de 1 :1000. L'acquisition des images a été réalisée sur des microscopes confocaux LSM 700 (Zeiss) ou SP8 (Leica).

## **Transplantations orthotopiques et analyse de survie**

Les GCPs de cervelets de souris *Ptch1<sup>+/-</sup>*; *Boc<sup>+/-</sup>* et *Ptch1<sup>+/-</sup>*; *Boc<sup>-/-</sup>* entre le jour postnatal 5 à 7 (P5-P7) ont été prélevées. Le vermis et les hémisphères des cervelets ont été séparés. Les GCPs provenant des hémisphères cérébelleux ont été dissociées avec la méthode décrite plus haut. Ces GCPs ont ensuite été directement injectées dans le cervelet de souris C57Bl/6 entre P2-P4. Les souris ont ensuite été incluses dans une analyse de survie et observées pour surveiller le développement de symptômes pouvant être associés avec une tumeur cérébelleuse.

## **Peignage de l'ADN (*DNA combing*)**

Le protocole de peignage de l'ADN a été publié antérieurement (18, 25). Pour cette expérience,  $1,2 \times 10^7$  GCPs ont été cultivées dans des puits de 60 mm pour chacune des conditions pour 24h. Les cellules ont été traitées avec du CldU à 25 mM (Sigma-Aldrich, C6891) pour 20 minutes. Un lavage avec du PBS à 37°C est ensuite réalisé. Les GCPs sont ensuite traitées avec de l'IdU à 125mM (Sigma-Aldrich, 17125) pour 20 minutes. Par la suite, les cellules sont prélevées à l'aide d'une pipette. Des blocs d'agarose (Bioshop, AGA101) sont alors réalisés avec une concentration de  $5 \times 10^6$  GCPs par 3 blocs. Puis, le processus de peignage de l'ADN est effectué selon un protocole précédemment publié par Gallo *et al.* (25). Les anticorps utilisés pour détecter l'IdU est le souris anti-BrdU B44 (BD, 347580) et pour le CldU est le rat anti-BrdU (Abcam, ab6326). Les images sont acquises avec un microscope à champ large (le Leica DM4000 ou le Zeiss AxioPhot) à une magnification de 63× ou 40×. Les mesures ont été prises à l'aide du logiciel ImageJ. Les fourches de réplication ont été repérées à l'aide l'anticorps anti-ssADN (MAB3034). La densité des fourches de réplication a été calculée en divisant le nombre de fourches par mégabases d'ADN (Mbp), et normalisée pour la phase S. La vitesse de la fourche de réplication a été calculée en divisant la longueur du signal IdU par 20 minutes (durée d'incubation avec IdU). L'asymétrie de la fourche de réplication est calculée comme suit :

asymétrie (%) =  $((\text{long IdU} - \text{court IdU}) - 1) \times 100$ . La distance interorigines est exprimée en kbp (18).

### **Préparation des métaphases**

Le protocole suivant a été adapté à partir d'un protocole publié par notre laboratoire (18). Les GCPs ont été cultivées dans un plat de 24 puits sur des lames circulaires recouvertes de poly-D-lysine (PDL) avec une densité de  $2 \times 10^5$  cellules/lame dans 500  $\mu\text{L}$  de milieu Neurobasal. Les cellules ont été traitées avec de la colcémide 0,02  $\mu\text{g}/\text{mL}$  à 37°C pour 1h. 350  $\mu\text{L}$  de milieu est retiré et 2 mL de KCl 75 mM à 37°C est ajouté lentement au milieu restant. Les cellules sont gardées à 37°C pour 15 minutes. 3 gouttes de fixateur (3 :1 méthanol/acide acétique) sont ajoutées à chacun des puits (préfixation). Après 2 minutes, la solution est retirée, et 500  $\mu\text{L}$  de fixateur sont ajoutés à chacun des puits pour 5 minutes (fixation). La fixation est reproduite deux autres fois. Les lames sont alors séchées à température pièce pour 15 minutes. Les métaphases sont ensuite utilisées pour l'analyse d'échange de chromatides sœurs.

### **Échange de chromatides sœurs**

Le protocole suivant a été adapté à partir d'un protocole publié par notre laboratoire (18). Les GCPs sont cultivées dans 5  $\mu\text{M}$  de BrdU pour 24h en présence de Shh 5 nM (pour toutes les conditions). Après 24h, un lavage de 5 minutes avec du Neurobasal à 37°C est réalisé pour retirer le BrdU. Les cellules sont alors incubées pour 36h en présence des différentes conditions. Les concentrations pour chacune des conditions sont les suivantes : B02 : 5  $\mu\text{M}$ , RI-1 5  $\mu\text{M}$ , B02+RI-1 : 2,5  $\mu\text{M}$  et 2,5  $\mu\text{M}$  respectivement. Lorsque celles-ci sont cultivées avec Shh, la concentration est de 10 nM.



## Chapitre 4 – Résultats

### Facteurs influençant le dommage à l'ADN des GCPs

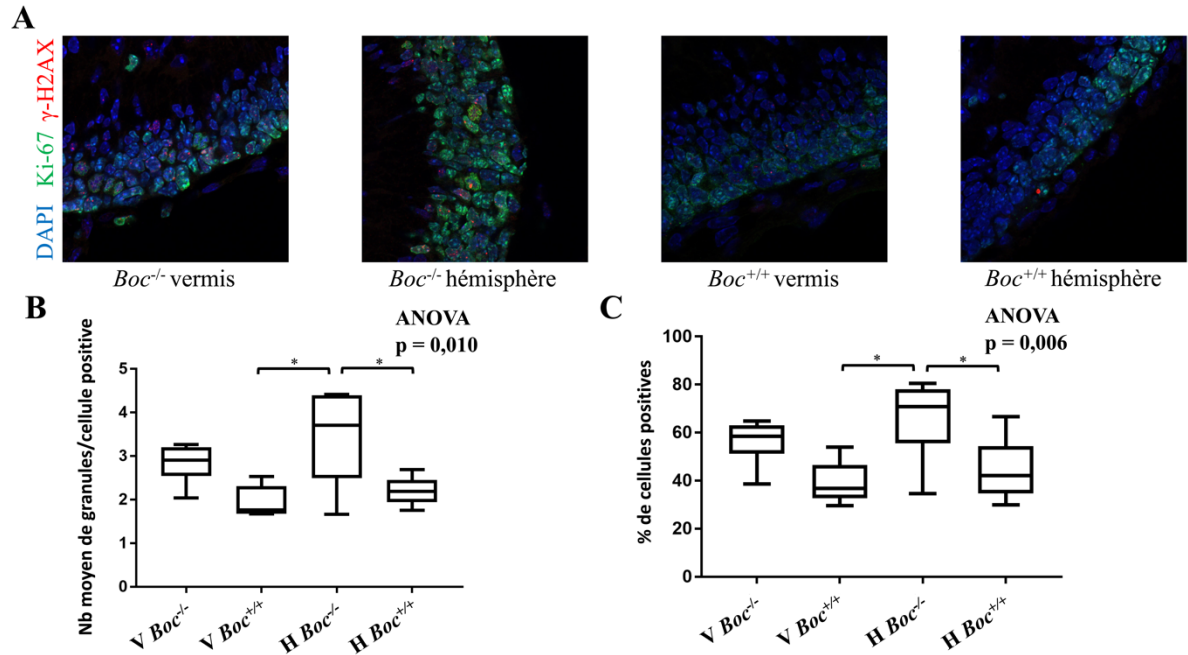
#### L'impact de la localisation hémisphérique dans le cervelet et du corécepteur Boc sur le dommage à l'ADN

Comme mentionné dans l'introduction, le ligand Shh sécrété par les cellules de Purkinje vient se lier au récepteur transmembranaire Ptch1. La liaison à un corécepteur est toutefois requise pour permettre l'activation de la cascade. Trois corécepteurs ont été identifiés, soit Boc, Cdon et Gas1. Il a été démontré que chez les vertébrés, la présence de l'un d'eux s'avère nécessaire à l'activation de la voie de signalisation hedgehog, le récepteur Ptch1 seul étant insuffisant (9, 11, 12). Un article de 2014 par Mille *et al.* issu de notre laboratoire a étudié le rôle du corécepteur Boc dans le développement du médulloblastome (12). Les données issues de cet ouvrage révèlent que Boc favorise le dommage à l'ADN par un mécanisme médié par CyclinD1, active la voie de signalisation hedgehog, augmente les chances de LOH de *Ptch1*, et favorise le développement de médulloblastomes (12). Inversement, l'inactivation du gène *Boc* diminue l'incidence de médulloblastome comme démontré dans une analyse de survie chez les souris *Ptch1<sup>+/-</sup>* (12). Il est à noter que Boc ne présente pas d'haploinsuffisance puisque la survie des souris *Boc<sup>+/+</sup>* est la même que celle des souris *Boc<sup>+/-</sup>* (12).

Par ailleurs, les SHH-MBs se distinguent des autres sous-groupes moléculaires, notamment par leur tendance à se développer dans les hémisphères cérébelleux, en opposition au vermis pour les autres sous-groupes. Ceci avait d'abord été observé pour les médulloblastomes du sous-type histologique desmoplasique (26), qui a été démontré comme

étant fortement associé au SHH-MBs (8). Le lien direct avec les SHH-MBs s'est confirmé par la suite (27-31). Il est à noter que les SHH-MBs chez les enfants de moins de 3 ans comportent une signature moléculaire différente et se distinguent aussi par leur localisation dans le vermis (32, 33).

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'impact de la présence du corécepteur Boc sur le dommage à l'ADN du cervelet en comparant le vermis aux hémisphères cérébelleux (Figure 3). Les résultats attendus étaient une augmentation du dommage à l'ADN étudié par une augmentation du signal  $\gamma$ -H2AX dans les hémisphères (en comparaison au vermis) et chez les souris *Boc* WT (en comparaison avec les souris *Boc*<sup>-/-</sup>). Nous avons donc prélevé le cervelet de souris P7 *Boc* WT et *Boc*<sup>-/-</sup> en séparant les hémisphères du vermis. À la suite de la fixation et de la coupe des spécimens, nous avons procédé à l'immunocoloration telle que décrite dans la section « Méthodologie » pour Ki-67 et  $\gamma$ -H2AX. Nous avons alors observé une tendance d'augmentation du signal  $\gamma$ -H2AX dans les hémisphères cérébelleux en comparaison avec le vermis des souris *Boc*<sup>-/-</sup>. Toutefois, de façon surprenante, le signal  $\gamma$ -H2AX avait tendance à être plus élevé chez les souris *Boc*<sup>-/-</sup> que chez les souris *Boc* WT (ce résultat atteignant une différence statistiquement significative, lorsqu'analysé dans les hémisphères). L'interprétation de ce résultat inattendu sera présentée dans la discussion.



**Figure 3. Impact du corécepteur Boc sur le dommage à l'ADN**

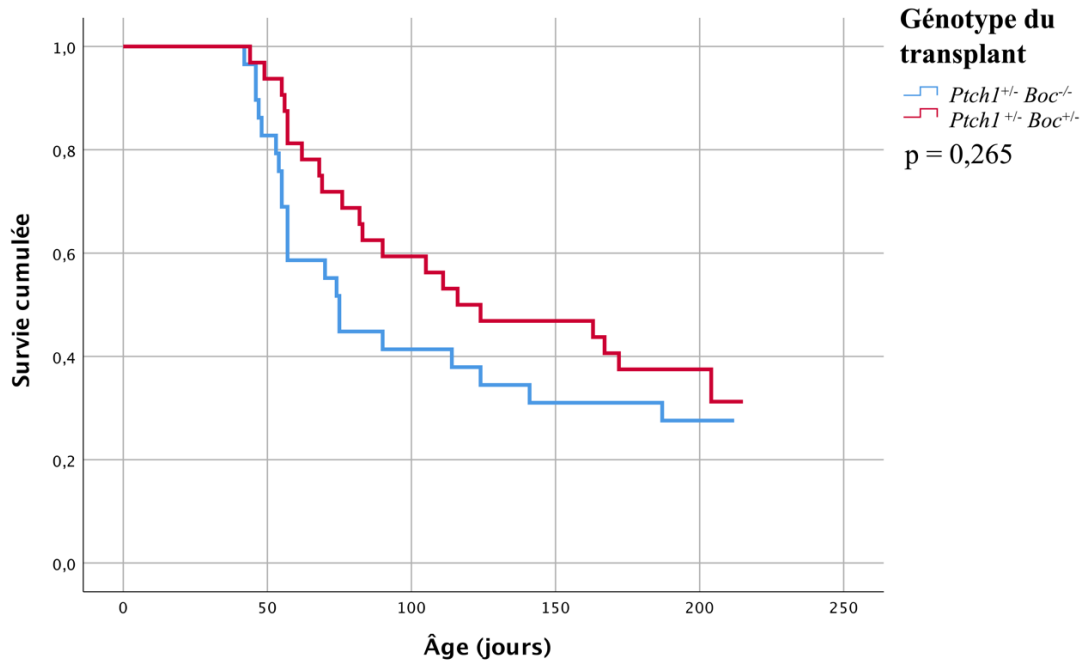
(A) Immunocoloration de cervelet de souris *Ptch1*<sup>+/-</sup>; *Boc* WT ou *Boc*<sup>-/-</sup> d'âge P7. DAPI (bleu), Ki-67 (vert),  $\gamma$ -H2AX (rouge). (B) Quantification du nombre moyen de granules de  $\gamma$ -H2AX par GCP positive pour chacune des conditions. (C) Quantification de la proportion de GCPs positives pour  $\gamma$ -H2AX pour chacune des conditions. (Vermis (V), hémisphère (H)). Nombre d'échantillons par condition : V *Boc* WT n = 5; V *Boc*<sup>-/-</sup> n = 6; H *Boc* WT n = 5; H *Boc*<sup>-/-</sup> n = 6. “ \* ” indique une p-value < 0.05 par l'analyse post-hoc de Tukey.

### L'impact du corécepteur Boc dans la tumorigénèse

Pour poursuivre, en allant dans le même sens que ce qui avait été démontré jusque-là dans la littérature (12), nous avons émis l'hypothèse que des GCPs *Ptch1*<sup>+/-</sup>; *Boc*<sup>+/-</sup> (i.e. des GCPs qui expriment Boc) seraient plus susceptibles de connaître une augmentation

du dommage à l'ADN et une transformation maligne par rapport à des GCPs *Ptch1<sup>+/-</sup>; Boc<sup>-/-</sup>* (il est à noter que, comme mentionné précédemment, nous n'observons pas d'haploinsuffisance pour le gène *Boc* (12)). Afin de tester cette hypothèse, nous avons procédé à des transplantations orthotopiques de GCPs *Ptch1<sup>+/-</sup>; Boc<sup>+/-</sup>* et *Ptch1<sup>+/-</sup>; Boc<sup>-/-</sup>* dans le cer-velet de souris *Ptch1* WT; *Boc* WT. Les souris ont ensuite été observées dans une analyse de survie. Les souris étaient surveillées dans l'animalerie du centre de recherche quoti-diennement afin de monitorer le développement de symptômes indiquant la possibilité du développement d'une tumeur cérébrale de la fosse postérieure, y compris une dété-rioration de l'état général, de l'anorexie ou une ataxie. Au moment du développement de ces symptômes, les souris étaient euthanasiées et une autopsie était pratiquée afin de confirmer la présence d'une tumeur. Nous n'avons pas observé de différence statistique-ment significative entre les groupes (Figure 4).





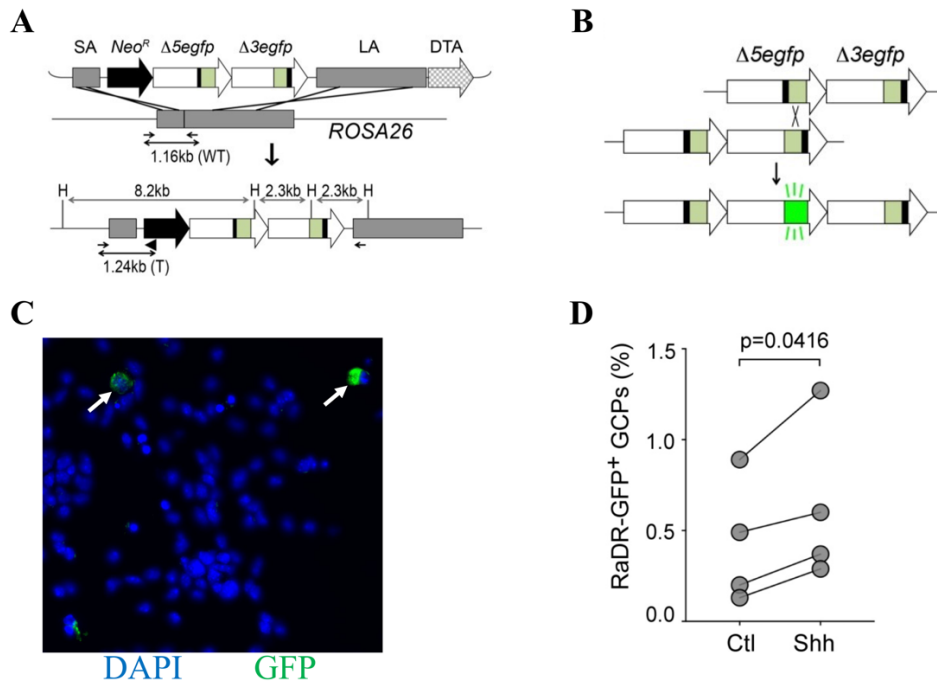
**Figure 4. Impact du gène *Boc* sur l'oncogénicité des GCPs *Ptch1*<sup>+/-</sup>**

Analyse de survie comparant les souris C57Bl/6 (P2) ayant subi une transplantation orthotopique cérébelleuse de GCPs *Ptch1*<sup>+/-</sup>; *Boc*<sup>+/-</sup> (n = 28) versus *Ptch1*<sup>+/-</sup>; *Boc*<sup>-/-</sup> (n = 26) provenant de souris d'âge P5-8. Aucune différence statistiquement significative n'a été décelée.

## La perte d'hétérozygotie de *Ptch1* et les évènements de recombinaison

### L'impact de Shh sur les évènements de recombinaison

Comme mentionné précédemment, des données de notre laboratoire démontrent que Shh accroît le stress lié à la réplication de l'ADN, augmente le dommage à l'ADN et augmente les évènements de recombinaison. Cette dernière conclusion a été démontrée par la hausse du nombre d'évènements de recombinaison testés par des expériences d'échanges de chromatides sœurs (18). Nous voulions tester ceci in vitro à l'aide d'une deuxième méthode. Une construction a été précédemment développée permettant d'exprimer GFP lors d'évènement de recombinaison (23). En effet, la construction RaDR-GFP introduite dans le locus Rosa26 réunit des EGFP assemblés en tandem. À la suite d'un évènement de recombinaison, l'alignement des cassettes permet la transcription de GFP et à la cellule de devenir fluorescente. Des souris portant cette construction ont été générées (23). Nous avons importé ce modèle de souris afin de tester l'impact de Shh sur la recombinaison. Nous avons donc prélevé les cervelets de souris *RaDR-GFP<sup>mut/mut</sup>* P5-7 à partir desquels nous avons dissocié les GCPs. Les GCPs ont été mises en culture cellulaire, puis une immunoloration avec DAPI et GFP a été réalisée (voir la section « Méthodologie » pour les détails des anticorps). Comme démontré par l'expérience d'échanges de chromatides sœurs et comme attendu, nous avons observé une augmentation des évènements de recombinaison par une différence statistiquement significative. Ceci nous a donc permis de confirmer par une deuxième méthode l'augmentation des évènements de recombinaisons causés par Shh dans les GCPs.



**Figure 5. Évènements de recombinaison marqués par la construction RaDR-GFP**

\*Figure modifiée à partir de l'article de Sukup-Jackson *et al.* (23).

(A, B) La construction RaDR-GFP introduite dans le locus Rosa26 réunit des EGFP assemblés en tandem. À la suite d'un évènement de recombinaison, l'alignement des cassettes permet la transcription de GFP tout en permettant à la cellule de devenir fluorescente. (C) Des GCPs cultivées en présence ou non de Shh ont été observées afin d'identifier des évènements de recombinaison (DAPI = bleu, GFP = vert; flèches blanches = cellules positives). (D) Les GCPs cultivées en présence de Shh démontraient de façon statistiquement significative une augmentation des évènements de recombinaison (n=4 expériences). 20 champs ont été photographiés par condition (la sélection des champs a été faite à l'aveugle).

## **La recombinaison comme mécanisme de LOH de *Ptch1* et RAD51 comme cible potentielle**

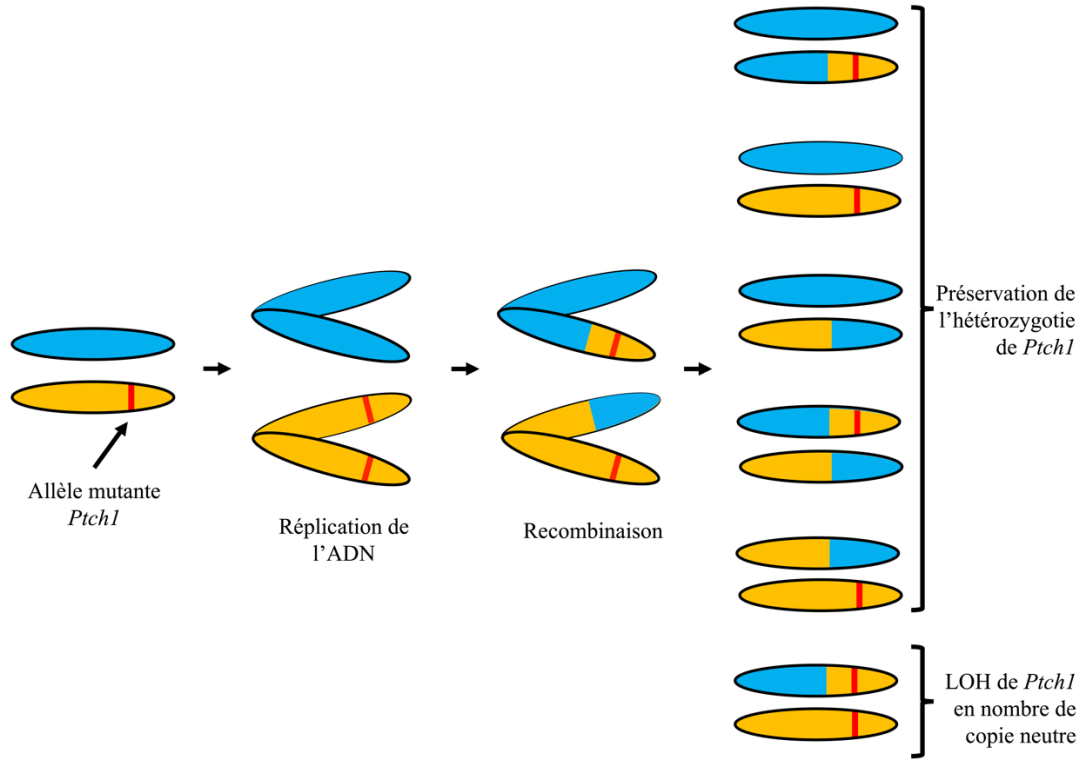
Comme mentionné en introduction, les travaux issus de notre laboratoire par *Tamayo-Orrego* et al. ont démontré que 25 % des SHH-MBs chez l'humain présentent un LOH en nombre de copies neutres (Figure 6). Chez la souris *Ptch1*<sup>+/-</sup>, ce nombre s'élève à 82 % (18). Ce phénomène peut être expliqué par un mécanisme de réparation du dommage à l'ADN double brin, soit la HR. La HR est un processus qui se réalise en trois étapes : la phase présynaptique, la phase synaptique et la phase post-synaptique (19, 20).

La phase présynaptique consiste à traiter la cassure d'ADN pour étendre la zone de simple brin d'ADN par l'action de nucléases et d'hélicases permettant par la suite à la protéine RPA de se lier à l'ADN simple brin. La protéine RAD51 vient alors reconnaître RPA et se lier au simple brin d'ADN afin de créer des filaments, et ce, à l'aide de protéines homologues (19, 20).

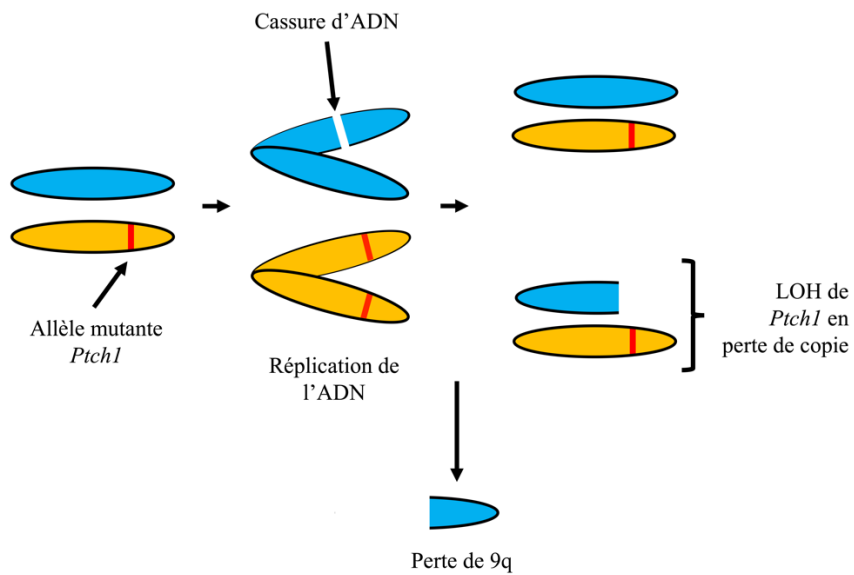
La phase synaptique se caractérise par la recherche de séquences homologues par le filament formé de protéines RAD51. Une fois cette séquence trouvée, le filament RAD51 procède à l'invasion de celle-ci, formant ainsi une *D-loop*. La protéine Rad54 s'avère quant à elle nécessaire afin de stabiliser la *D-loop*, puis de dissocier le filament de protéines RAD51 afin de préparer le complexe à la synthèse d'ADN (19, 20).

La phase post-synaptique consiste à résoudre le *D-loop* par une des trois méthodes potentielles pour synthétiser l'ADN requis : la réplication induite par une cassure (BIR), la réparation par appariement entre molécules d'ADN simple brin dépendante de la synthèse (SDSA) et la conversion de gène (19). Les événements de recombinaison sont généralement générés lorsque le processus de HR est complété via la BIR. Ce processus est notamment reconnu pour pouvoir mener à une LOH (19, 20).

**A**



**B**

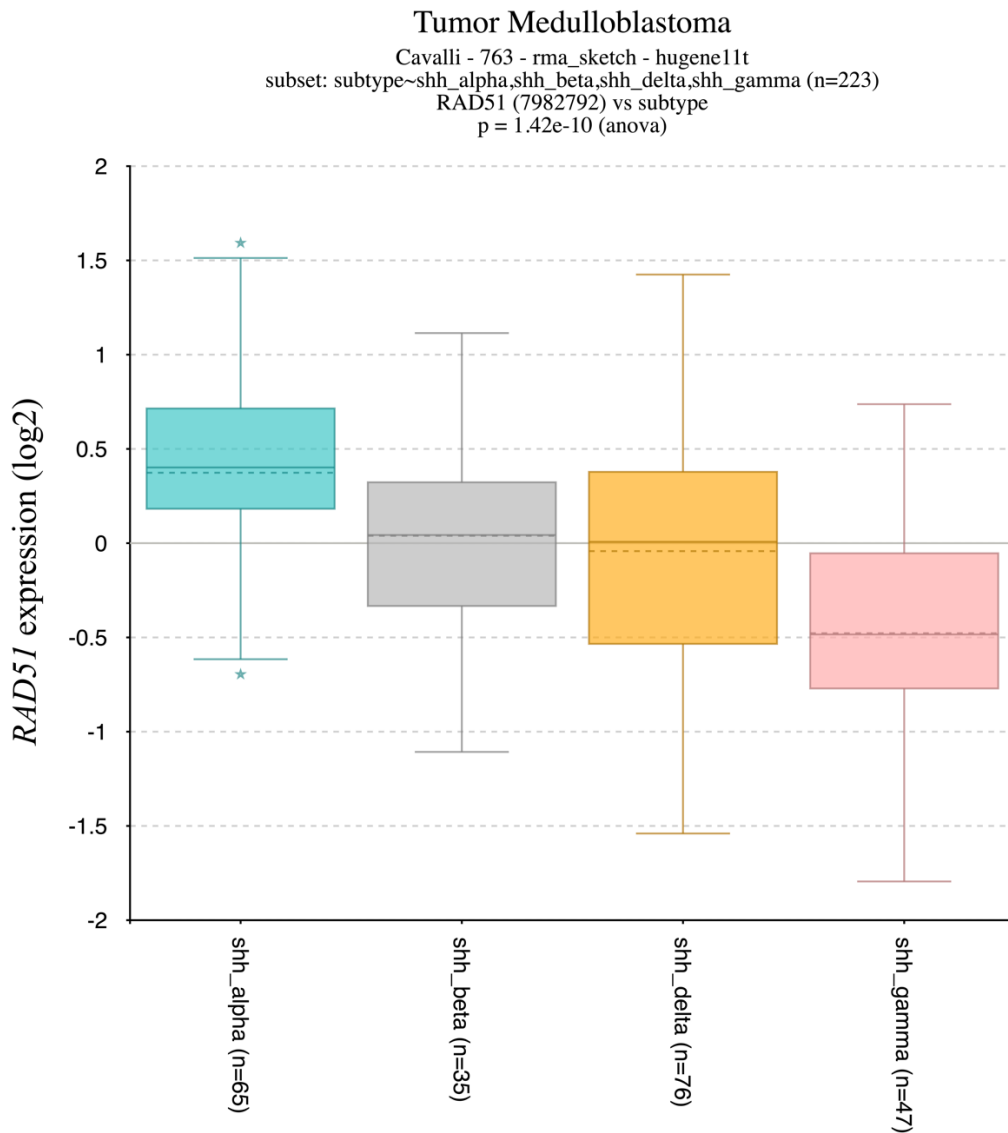


## Figure 6. Perte d'hétérozygotie en nombre de copies neutres

\*Figure inspirée d'une figure provenant de l'article de Tamayo *et al.*(18)

A. Schéma démontrant la réplication d'ADN murin contenant une mutation *Ptch1* au niveau du chromosome 9q. Ce procédé associé à la recombinaison homologue implique la possibilité d'un produit résultant à une LOH de *Ptch1* en nombre de copies neutres (sans perte d'ADN). B. Schéma démontrant un procédé menant à une LOH de *Ptch1* en perte de copie suivant une cassure d'ADN.

Dans notre modèle, notre laboratoire a démontré que, dans les GCPs, le stress réplicatif induit par Shh engendrait une augmentation du dommage double brin à l'ADN, ainsi qu'une augmentation des événements de recombinaison (18). Nous avons donc cherché à moduler le processus de HR pour tenter de diminuer ces événements de recombinaison et ainsi potentiellement limiter le risque de LOH. Il a été établi que l'inhibition de RAD51 avec des siRNAs diminue les événements de recombinaison dans des expériences d'échanges de chromatides sœurs (34). De plus, *RAD51* est surexprimé dans les médulloblastomes de type SHH-MB $\alpha$  en comparaison avec les autres sous-groupes de SHH-MBs selon une analyse d'une banque de données de MBs humains (Figure 7) (7). Pour ces raisons et parce que RAD51 joue un rôle central dans la HR, la modulation de RAD51 nous semblait une cible idéale pour tenter de moduler les événements de recombinaison et ainsi potentiellement limiter le risque de LOH.



**Figure 7. L'expression de RAD51 chez les médulloblastomes humains**

Expression de RAD51 dans les différents sous-groupes de SHH-MBs provenant de la base de données Cavalli comprenant 223 SHH-MBs (7) (analyse avec R2, analyse statistique par un test ANOVA).

## **L'impact de l'inhibition de RAD51 sur les évènements de recombinaison**

Quelques agents ont été développés pour moduler l'activité de RAD51. Nous avons retenu deux inhibiteurs qui semblaient prometteurs à tester dans notre modèle : RI-1 et B02. RI-1 se lie de façon covalente à la cystéine 319 située à la surface de la protéine RAD51 afin de déstabiliser l'interface utilisée par RAD51 pour créer un oligomère à la construction des filaments (35). B02 inhibe spécifiquement l'activité d'échange de brins d'ADN par RAD51 (36). Nous avons donc testé l'effet de ces inhibiteurs de Rad51 sur des GCPs murines afin d'observer l'effet sur la recombinaison. Nous avons disséqué les cervelets de souris P5-7, puis isolé les GCPs grâce à la méthode de dissociation expliquée dans la section « Méthodologie ». Les cellules ont ensuite été mises en culture en présence de Shh. Dans les 24h suivant la mise en culture, les cellules ont été mises en contact avec les conditions particulières pour l'expérience, soit les inhibiteurs de Rad51 (ou le contrôle DMSO avec ou sans Shh) et Shh. Les métaphases ont été préparées, puis les cellules fixées environ dans les 36h suivant l'exposition aux différentes conditions. L'immunofluorescence et la microscopie ont ensuite été réalisées telles que décrites dans la section « Méthodologie ». Bien que les résultats n'aient pas atteint un seuil statistiquement significatif, nous observons une tendance à l'augmentation du nombre d'évènements de recombinaison avec Shh qui est diminuée avec l'exposition aux inhibiteurs de RAD51 (Figure 8).

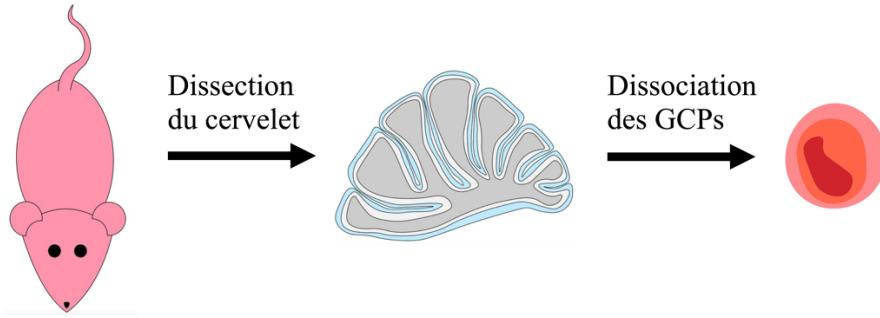




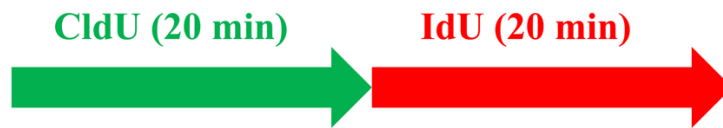
## **L'inhibition de Cdc7 et son impact sur la réplication de l'ADN**

Dans les travaux de Tamayo-Orrego *et al.* publiés par notre laboratoire et auxquels j'ai participé, nous démontrons que l'augmentation du dommage double brin à l'ADN induit par le stress lié à la réplication de l'ADN est médié par une augmentation du nombre d'origines de réplication et de la vitesse des fourches de réplication (18). Chez la souris, les origines de réplication sont créées par la liaison de Mcm2 sur l'ADN et sa phosphorylation par la kinase Cdc7. Shh induit une augmentation de la liaison de Mcm2, ainsi qu'une augmentation de l'activité de Cdc7. En utilisant un inhibiteur de Cdc7, nous avons observé une diminution du nombre d'origines de réplifications chez les GCPs exposées à Shh (le nombre d'origines de réplication étant inversement proportionnel à la distance interorigines) (Figure 10). Ceci a été démontré dans une expérience de peignage de l'ADN consistant à marquer l'ADN avec des analogues de la thymidine (CldU et IdU) de façon successive, puis à utiliser une technique de peignage de l'ADN afin de la dérouler et d'identifier les origines de réplication, la distance interorigines et la vitesse de réplication (Figure 9) (voir la section « Méthodologie » pour les détails de l'expérience).

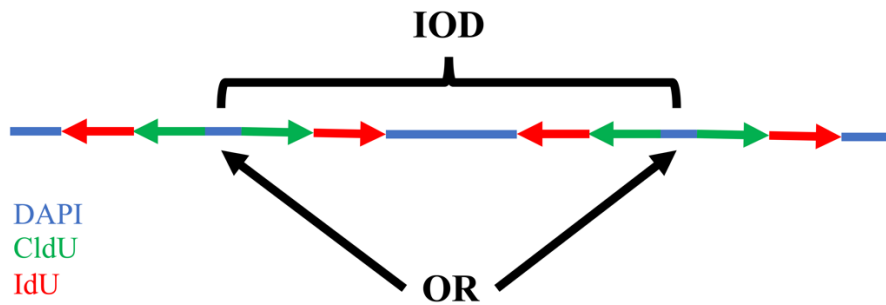
**A**



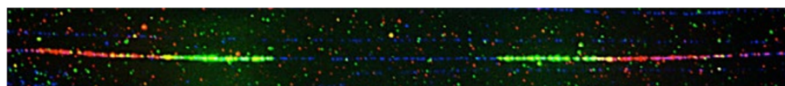
**B**



**C**



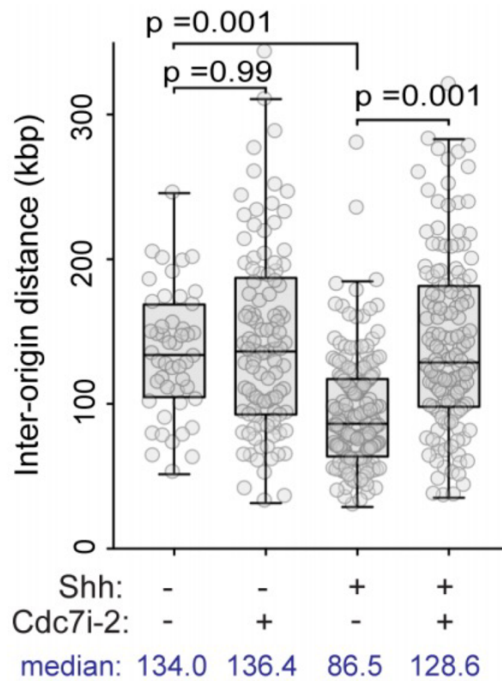
**D**



### **Figure 9. Technique de peignage de l'ADN sur des GCPs dissociées**

\*Figure (section D) modifiée provenant d'un l'article par Tamayo *et al.* (18)

A. Les cervelets de souris P5-7 sont disséqués et les méninges retirées délicatement. Les GCPs sont ensuite dissociées et cultivées par une méthode déjà expliquée (voir la section « Méthodologie »). B. Les cellules sont séquentiellement exposées à CldU (20 minutes), puis IdU (20 minutes). C. Schéma de l'image obtenue après le peignage de l'ADN (voir la section « Méthodologie »). Nous pouvons identifier les origines de réplication (OR), ainsi que la distance interorigines (IOD). D. Exemple d'image obtenue grâce à un microscope confocal (Anticorps et détails de l'imagerie microscopique disponibles dans la section « Méthodologie »).



**Figure 10. Peignage de l'ADN chez des GCPs exposées à un inhibiteur de Cdc7**

\*Figure modifiée provenant d'un l'article par Tamayo et al. (18)

Mesure de la distance interorigines par un procédé de peignage de l'ADN. Des GCPs sont cultivées avec ou sans présence de Shh 10 nM et avec ou sans présence de l'inhibiteur de Cdc7 (Cdc7i-2 = TAK931) à 200 nM. L'analyse statistique utilise le test de Kruskal-Wallis. Voici le nombre de distances interorigines calculées par condition : n= 49 pour Shh-/Cdc7i-2-, n=108 pour Shh-/Cdc7i-2+, n=173 pour Shh+/Cdc7i-2-, and n=146 pour Shh+/Cdc7i-2+, sur une expérience. Les médianes pour chacune des conditions sont indiquées en bleu sous le graphique.

## L'impact du gène *Mcm2* sur la réplication de l'ADN

Puisqu'une diminution de la phosphorylation de Mcm2 avec un inhibiteur de Cdc7 diminue le nombre d'origines de réplication, nous avons émis l'hypothèse que nous observerions une diminution du nombre d'origines de réplifications dans la GCP si l'expression du gène *Mcm2* était réduite. Nous avons donc utilisé un modèle de souris hétérozygote pour le gène *Mcm2* pour tester cette hypothèse. Pour ce faire, nous avons dissocié les GCPs issues de cervelets de souris de 7 jours de vie. Nous avons cultivé les cellules et avons procédé à une expérience de peignage de l'ADN (voir section « Méthodologie »). Comme observé avec l'inhibiteur de Cdc7, les souris *Mcm2*<sup>+/-</sup> ont démontré une diminution du nombre d'origines de réplication mesurées par une distance interorigines augmentée comparativement aux souris *Mcm2* WT (Figure 11). Ces résultats sont compatibles avec un rôle de Mcm2 en aval de Cdc7.

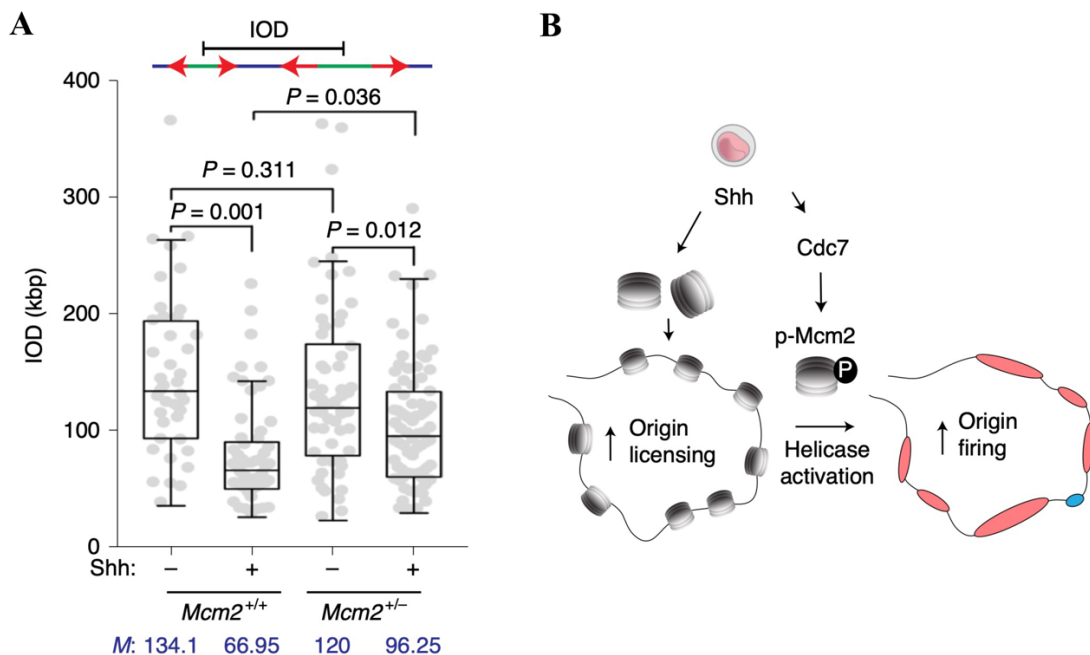


Figure 11. Peignage de l'ADN chez des GCPs selon leur statut *Mcm2*

\*Figure modifiée provenant de Tamayo *et al.* (18)

(A) Mesure de la distance interorigines par un procédé de peignage de l'ADN. Des GCPs issues de souris P7  $Mcm2^{+/+}$  ou  $Mcm2^{+/-}$  sont cultivées avec ou sans présence de Shh 10 nM. L'analyse statistique utilise le test d'ANOVA à un facteur contrôlé et le test de post-hoc de Tukey. Voici le nombre de distances interorigines calculées par condition : n = 40 pour  $Mcm2^{+/+}$ ; n = 56 pour  $Mcm2^{+/+}$  + Shh; n = 57 pour  $Mcm2^{+/-}$ ; n = 78 pour  $Mcm2^{+/-}$  + Shh, provenant de deux expériences. Les médianes pour chacune des conditions sont indiquées en bleu sous le graphique.





## Chapitre 5 – Discussion

Le processus de tumorigenèse permettant à une GCP de se transformer en médulloblastome est complexe. En effet, tel que décrit précédemment, cette transition se caractérise par un processus en deux étapes, la première étant la LOH de *Ptch1*<sup>+/-</sup> menant vers une lésion prénéoplasique qui, sans autre mutation, mènera à la sénescence cellulaire. L'acquisition d'une deuxième mutation, soit une mutation *p53* ou une inactivation *p16*<sup>ink4a</sup>, peut permettre d'éviter la sénescence cellulaire et d'atteindre le statut de tumeur maligne. Les résultats présentés dans le cadre de cet ouvrage traitent de la première étape de cette tumorigenèse et cherchent à mieux caractériser le mécanisme par lequel une GCP acquerra la LOH de *Ptch1*<sup>+/-</sup>.

Dans la première expérience, nous retrouvons une tendance allant dans le sens de notre hypothèse (bien que la différence ne soit pas statistiquement significative), soit que le dommage à l'ADN semble plus important dans les hémisphères cérébelleux que le vermis chez les souris en développement (Figure 3). Toutefois, nous nous attendions à obtenir une diminution du dommage à l'ADN chez les souris *Ptch1*<sup>+/-</sup>; *Boc*<sup>-/-</sup> par rapport à celles *Ptch1*<sup>+/-</sup>; *Boc* WT. Nous avons toutefois observé la tendance contraire (qui s'est avérée statistiquement significative dans les hémisphères) (Figure 3). Ceci va à l'encontre de ce qui avait été démontré *in vitro* (12). De plus, la même tendance inattendue, bien que non statistiquement significative, a été observée dans l'analyse de survie comparant les souris *Ptch1*<sup>+/-</sup>; *Boc*<sup>-/-</sup> à celles *Ptch1*<sup>+/-</sup>; *Boc*<sup>+/-</sup> (Figure 4). Ces deux résultats laissent présager la possibilité qu'un facteur non identifié altère la fonction du corécepteur Boc *in vivo* qui ne semble pas présent *in vitro*. Il est également possible que des facteurs compensatoires absents *in vitro* soient présents *in vivo*.

L'impact du ligand Shh sur le stress réplicatif et les événements de recombinaison ont été établis par des analyses d'échanges de chromatides sœurs dans l'article par Tamayo-Orrego *et al.* (18) auquel j'ai participé. Les GCPs issues de cervelets de souris *RaDR-GFP* mutantes nous ont permis de confirmer cette augmentation des événements de recombinaison par une méthode indépendante et ainsi bonifier cette démonstration (Figure 5). Il est maintenant admis que Shh entraîne une augmentation de la recombinaison chez les GCPs.

Nous reprenons ensuite les données précédemment publiées démontrant que, chez les GCPs, Shh induit un stress réplicatif menant à une hausse des dommages double brin à l'ADN, une augmentation des événements de recombinaison, augmentant ainsi le risque de LOH (18). Ce mécanisme serait à l'origine de la première étape de la tumorigenèse, soit la LOH de *Ptch1*. Plus précisément, ces événements de recombinaison sont dus au mécanisme de réparation de dommage double brin à l'ADN, soit la HR (18). Nous avons tenté de moduler l'activité de RAD51, protéine au centre du mécanisme de HR, afin d'en observer l'effet sur la HR. L'expérience effectuée présente une tendance de sauvetage de l'effet de Shh grâce à RI-1 et B02, deux inhibiteurs de RAD51, bien que les différences exposées n'aient pas atteint un seuil statistiquement significatif (Figure 8). Ceci nous emmène à penser que l'utilisation de tels inhibiteurs pourrait constituer une avenue prometteuse dans la diminution des événements de recombinaison et la prévention du risque de LOH.

Nous avons utilisé la méthode de peignage de l'ADN comme méthode pour tester et imager l'impact de certaines modulations sur la réplication de l'ADN. Tout d'abord, nous avons confirmé l'augmentation du nombre d'origines de réplication causé par le ligand Shh sur des GCPs *in vitro* (Figure 10). Ensuite, en inhibant la kinase Cdc7 responsable de la phosphorylation de *Mcm2* sur des GCPs postnatales, nous avons démontré une diminution du nombre d'origines de réplication (Figure 10), annulant ainsi l'impact du ligand Shh sur la réplication. Par la suite, nous avons isolé des GCPs issues de souris *Mcm2* WT

et *Mcm2*<sup>+/-</sup> et avons constaté le même effet, soit une diminution de l'augmentation du nombre d'origines de réplication et le stress répliatif causé par Shh (Figure 11). Nous prouvons ainsi le rôle de Shh dans le stress répliatif pouvant induire des dommages double brin à l'ADN et que ceci est modulable à l'aide de cibles comme *Mcm2* et la kinase *Cdc7*.



## Chapitre 6 – Conclusion

L'ère moléculaire a particulièrement bouleversé la caractérisation, le diagnostic, la prise en charge et la recherche en lien avec le médulloblastome. Nous nous sommes rendu compte que ce diagnostic englobe en fait des maladies très différentes, de la cellule d'origine jusqu'aux voies de signalisation impliquées. Les SHH-MBs ont particulièrement été étudiés dans les dernières années, permettant de mieux caractériser leur développement et d'établir des possibilités de plus en plus réalistes d'atteindre un traitement ciblé pour traiter ou même prévenir le développement de ces tumeurs. Cet ouvrage présente une tentative de mieux caractériser la première étape de cette tumorigenèse en deux étapes, soit la LOH de *Ptch1*. Le dommage à l'ADN résultant du stress de réplication induit par Shh favorise la survenue d'évènement de recombinaisons qui sont à l'origine de cette LOH. Cette cascade d'évènement pourrait potentiellement être modulable afin de prévenir cette LOH et la suite de la tumorigenèse. Toutefois, des travaux additionnels pour tester de nouveaux agents modulant ce mécanisme s'avèrent nécessaires afin d'obtenir des résultats cliniquement significatifs. Cette avenue semble néanmoins prometteuse et des avancées dans ce domaine sont nécessaires afin d'améliorer le devenir des patients affligés par cette maladie qui sont trop nombreux et trop affectés de façon permanente par les traitements actuels non ciblés.



## Références bibliographiques

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Ellison DW, Figarella-Branger D, et al. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Revised 4th Edition ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2016. 408 p.
2. Central Nervous System Tumours: WHO Classification of Tumours. 5th edition ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2021. 568 p.
3. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021;23(8):1231-51.
4. Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. *Neuro Oncol.* 2021;23(12 Suppl 2):iii1-iii105.
5. Bernier V, Klein O. Late effects of craniospinal irradiation for medulloblastomas in paediatric patients. *Neurochirurgie.* 2021;67(1):83-6.
6. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho Y-J, Clifford SC, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathologica.* 2012;123(4):465-72.
7. Cavalli FMG, Remke M, Rampasek L, Peacock J, Shih DJH, Luu B, et al. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer Cell.* 2017;31(6):737-54.e6.
8. Kool M, Korshunov A, Remke M, Jones DT, Schlanstein M, Northcott PA, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of

- transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol.* 2012;123(4):473-84.
9. Izzi L, Lévesque M, Morin S, Laniel D, Wilkes BC, Mille F, et al. Boc and Gas1 each form distinct Shh receptor complexes with Ptch1 and are required for Shh-mediated cell proliferation. *Dev Cell.* 2011;20(6):788-801.
  10. Sillitoe RV, Joyner AL. Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:549-77.
  11. Allen BL, Song JY, Izzi L, Althaus IW, Kang JS, Charron F, et al. Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function. *Dev Cell.* 2011;20(6):775-87.
  12. Mille F, Tamayo-Orrego L, Lévesque M, Remke M, Korshunov A, Cardin J, et al. The Shh receptor Boc promotes progression of early medulloblastoma to advanced tumors. *Dev Cell.* 2014;31(1):34-47.
  13. Goodrich LV, Milenković L, Higgins KM, Scott MP. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science.* 1997;277(5329):1109-13.
  14. Ayrault O, Zindy F, Rehg J, Sherr CJ, Roussel MF. Two tumor suppressors, p27Kip1 and patched-1, collaborate to prevent medulloblastoma. *Mol Cancer Res.* 2009;7(1):33-40.
  15. Pazzaglia S, Tanori M, Mancuso M, Gessi M, Pasquali E, Leonardi S, et al. Two-hit model for progression of medulloblastoma preneoplasia in Patched heterozygous mice. *Oncogene.* 2006;25(40):5575-80.
  16. Tamayo-Orrego L, Wu CL, Bouchard N, Khedher A, Swikert SM, Remke M, et al. Evasion of Cell Senescence Leads to Medulloblastoma Progression. *Cell Rep.* 2016;14(12):2925-37.



17. Tamayo-Orrego L, Swikert SM, Charron F. Evasion of cell senescence in SHH medulloblastoma. *Cell Cycle*. 2016;15(16):2102-7.
18. Tamayo-Orrego L, Gallo D, Racicot F, Bemmo A, Mohan S, Ho B, et al. Sonic hedgehog accelerates DNA replication to cause replication stress promoting cancer initiation in medulloblastoma. *Nat Cancer*. 2020;1(8):840-54.
19. Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet*. 2010;44:113-39.
20. Godin SK, Sullivan MR, Bernstein KA. Novel insights into RAD51 activity and regulation during homologous recombination and DNA replication. *Biochem Cell Biol*. 2016;94(5):407-18.
21. Okada A, Charron F, Morin S, Shin DS, Wong K, Fabre PJ, et al. Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature*. 2006;444(7117):369-73.
22. Pruitt SC, Bailey KJ, Freeland A. Reduced Mcm2 expression results in severe stem/progenitor cell deficiency and cancer. *Stem Cells*. 2007;25(12):3121-32.
23. Sukup-Jackson MR, Kiraly O, Kay JE, Na L, Rowland EA, Winther KE, et al. Rosa26-GFP direct repeat (RaDR-GFP) mice reveal tissue- and age-dependence of homologous recombination in mammals in vivo. *PLoS Genet*. 2014;10(6):e1004299.
24. Wechsler-Reya RJ, Scott MP. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron*. 1999;22(1):103-14.
25. Gallo D, Wang G, Yip CM, Brown GW. Analysis of Replicating Yeast Chromosomes by DNA Combing. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016;2016(2):pdb.prot085118.
26. Pramanik P, Sharma MC, Mukhopadhyay P, Singh VP, Sarkar C. A comparative study of classical vs. desmoplastic medulloblastomas. *Neurol India*. 2003;51(1):27-34.

27. Gibson P, Tong Y, Robinson G, Thompson MC, Currie DS, Eden C, et al. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature*. 2010;468(7327):1095-9.
28. Grammel D, Warmuth-Metz M, von Bueren AO, Kool M, Pietsch T, Kretzschmar HA, et al. Sonic hedgehog-associated medulloblastoma arising from the cochlear nuclei of the brainstem. *Acta Neuropathol*. 2012;123(4):601-14.
29. Tan IL, Wojcinski A, Rallapalli H, Lao Z, Sanghrajka RM, Stephen D, et al. Lateral cerebellum is preferentially sensitive to high sonic hedgehog signaling and medulloblastoma formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(13):3392-7.
30. Teo WY, Shen J, Su JM, Yu A, Wang J, Chow WY, et al. Implications of tumor location on subtypes of medulloblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(9):1408-10.
31. Wefers AK, Warmuth-Metz M, Pöschl J, von Bueren AO, Monoranu CM, Seelos K, et al. Subgroup-specific localization of human medulloblastoma based on pre-operative MRI. *Acta Neuropathol*. 2014;127(6):931-3.
32. Northcott PA, Hielscher T, Dubuc A, Mack S, Shih D, Remke M, et al. Pediatric and adult sonic hedgehog medulloblastomas are clinically and molecularly distinct. *Acta Neuropathol*. 2011;122(2):231-40.
33. Zhao F, Li C, Zhou Q, Qu P, Wang B, Wang X, et al. Distinctive localization and MRI features correlate of molecular subgroups in adult medulloblastoma. *J Neurooncol*. 2017;135(2):353-60.
34. Lahkim Bennani-Belhaj K, Rouzeau S, Buhagiar-Labarchède G, Chabosseau P, Onclercq-Delic R, Bayart E, et al. The Bloom syndrome protein limits the lethality associated with RAD51 deficiency. *Mol Cancer Res*. 2010;8(3):385-94.
35. Budke B, Logan HL, Kalin JH, Zelivianskaia AS, Cameron McGuire W, Miller LL, et al. RI-1: a chemical inhibitor of RAD51 that disrupts homologous recombination in human cells. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(15):7347-57.

36. Huang F, Mazina OM, Zentner IJ, Cocklin S, Mazin AV. Inhibition of homologous recombination in human cells by targeting RAD51 recombinase. *J Med Chem.* 2012;55(7):3011-20.