



**HAL**  
open science

# ETUDE DES ALTÉRATIONS EPIGENETIQUES DES TUMEURS DESENFANTS : LE CAS DES ÉPENDYMOMES ET DES NEUROBLASTOMES

Mariana Michalowski

► **To cite this version:**

Mariana Michalowski. ETUDE DES ALTÉRATIONS EPIGENETIQUES DES TUMEURS DESENFANTS : LE CAS DES ÉPENDYMOMES ET DES NEUROBLASTOMES. Ingénierie biomédicale. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00115184

**HAL Id: tel-00115184**

**<https://theses.hal.science/tel-00115184>**

Submitted on 20 Nov 2006

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE PAR  
**Mariana Bohns MICHALOWSKI**  
EN VUE DE L'OBTENTION DU TITRE DE  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I  
(ARRETÉS MINITÉRIELS DU 5 JUILLET 1984 ET DU 30 MARS 1992)  
SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE

**ETUDE DES ALTÉRATIONS EPIGENETIQUES DES TUMEURS DES  
ENFANTS : LE CAS DES ÉPENDYMOMES ET DES NEUROBLASTOMES**

Soutenue à Grenoble le 15 novembre 2006 devant le jury composé de :

Monsieur Dominique Plantaz, Professeur

Monsieur Olivier Delattre, Professeur

Monsieur Pascal Chastagner, Professeur

Madame Marie-Christine Favrot, Professeur

Mademoiselle Florence de Fraipont, Praticien Hospitalier

Thèse préparée au sein de l'UF Cancérologie Biologique et Biothérapie, Centre Hospitalier et Universitaire de Grenoble, France.



*« Sur l'avenir, tout le monde se trompe. L'homme ne peut être sûr que du moment présent. Mais est-ce bien vrai ? Peut-il vraiment le connaître, le présent ? Est-il capable de le juger ? Bien sûr que non. Car comment celui qui ne connaît pas l'avenir pourrait-il comprendre le sens du présent ? Si nous ne savons pas vers quel avenir le présent nous mène, comment pourrions-nous dire que ce présent est bon ou mauvais, qu'il mérite notre adhésion, notre méfiance ou notre haine ? »*

*Milan Kundera, L'ignorance*



# REMERCIEMENTS

---

---

Je tiens à remercier tout d'abord le Professeur Dominique Plantaz et le Professeur Marie-Christine Favrot pour leur accueil au sein du Service de Pédiatrie et de l'UF Cancérologie et Biothérapie. Merci à Mr Plantaz pour toute la confiance qu'il m'a offert pendant ses années passées en France.

J'exprime ma profonde reconnaissance au Docteur Florence de Fraipont pour avoir encadré ce travail dans une ambiance encourageante. Je la remercie pour ses conseils et soutien et pour avoir relu ma thèse.

Je remercie également respectueusement le Docteur Olivier Delattre pour avoir pris de son temps en acceptant d'être rapporteur de cette thèse.

Je suis également reconnaissante au Docteur Pascal Chastagner de me faire l'honneur d'être rapporteur de ce travail.

Je remercie également tout ceux qui ont permis, de près ou de loin, à ce travail de se faire. Merci aux techniciennes du laboratoire, spécialement à Monique Delon, pour leur aide avec toutes les techniques utilisées.

Merci au gouvernement du Brésil et le « Ministério da Ciência e Tecnologia » qui a permis ma venue en France et tout l'apprentissage clinique et scientifique par le biais de la bourse du Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Merci à mes amis français qui m'ont tant aidé avec l'apprentissage de la culture et habitudes locales. Um merci spéciale à Virginie, Renauld, Stéphane, Marie-Ange.

Merci à ma famille pour leur soutien.

## *REMERCIEMENTS*

---

Enfin, je tiens à remercier Leonardo pour son support inconditionnel. Merci de m'avoir toujours épaulée, d'être là à mes côtés et me soutenir. Merci de partager ta vie avec moi. Même si je ne connais pas l'avenir, il n'existe pas sans toi.

# RESUME

---

---

Au cours des dernières années, un nouveau mécanisme du développement tumoral a été décrit; l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeur (GST). Les modifications « épigénétiques » ont été peu étudiées dans les cancers de l'enfant et aucune grande série de tumeurs pédiatriques n'existait avant 2002. Nous avons recherché ce type d'altérations dans deux groupes de tumeurs de l'enfant: les épendymomes et les neuroblastomes. Les épendymomes (EP) représentent la troisième tumeur la plus fréquente du système nerveux central (SNC) de l'enfant et n'a pas de marqueurs biologiques pronostiques identifiés. Le neuroblastome, quant à lui, est la tumeur solide extra crânienne la plus fréquente chez l'enfant et présente des anomalies génétiques et moléculaires qui ont été clairement liées au pronostic. Nos objectifs étaient de décrire un profil de méthylation de ces deux cancers de l'enfant et chercher des relations possibles avec l'évolution clinique. Dans la première étude, une série de 27 enfants avec un EP intracrânien et 7 avec papillome du plexus choroïde a été étudiée. Nous avons décrit et comparé le statut de méthylation de 19 gènes. Dans la deuxième étude, 62 neuroblastomes (NB) ont été évalués pour le statut de la méthylation de ces gènes. Nous n'avons pas trouvé de relation statistiquement significative entre la méthylation et l'évolution clinique, mais les méthylationes ne semblent pas être distribuées sous une forme aléatoire dans les EP et les NB et peut représenter un mécanisme de développement et d'évolution tumorale. L'hyperméthylation a été corrélée au stade clinique des NB: stades 1, 2 et 4s étaient moins fréquemment méthylés que les stades 3 et 4 ( $p = 0.002$ ). En conclusion, les résultats de nos séries indiquent que la méthylation des gènes suppresseurs peut avoir un rôle dans l'évolution et le développement des cancers de l'enfant. L'étude des altérations épigénétiques est nécessaire pour améliorer la compréhension des mécanismes de la carcinogenèse dans les tumeurs pédiatriques. Ces altérations pourraient, donc, être utilisées comme des marqueurs de maladies ou d'évolutivité et les gènes méthylés pourraient être considérés comme des nouvelles cibles thérapeutiques.





# ABSTRACT

---

---

During the last 10 years, a new mechanism of tumor development has been described: the hypermethylation of tumor suppressor genes. These epigenetic modifications were rarely studied in childhood cancer and large series of patients didn't exist before 2003. We studied two groups of childhood tumors; ependymoma and neuroblastoma. Ependymomas (EP) represent the third most frequent type of central nervous system (CNS) tumor of childhood. No prognostic biological markers are available, and differentiation from choroid plexus papilloma (CPP) is difficult. On the other hand, neuroblastoma, the most common extracranial solid cancer diagnosed in infancy and childhood, has some genetic abnormalities that are clearly related to prognosis as NMYC amplification. Our objectives were to describe a methylation profile in these two childhood cancers and try to find a relationship between genes methylation and clinical evolution. In the first study, for a sample of 27 children with intracranial EP and 7 with CPP, we described and compared the methylation status of 19 genes. On the second study, 62 neuroblastomas were studied in terms of the methylation status of the same genes. Although we did not observe a statistical relationship between methylation and clinical outcome, the methylation pattern does not appear to be randomly distributed in ependymoma and in neuroblastoma and may represent a mechanism of tumor development and evolution. Hypermethylation was related to clinical stage in neuroblastoma: stages 1, 2 and 4s were less frequently methylated than those at stages 3 and 4 ( $p = 0.002$ ). In conclusion, the results from our series indicate that hypermethylation of tumor suppressor genes may be important in the development and evolution of childhood cancers. Thus, these epigenetic alterations could be used as a marker of the disease and genes regulating methylation should be considered as possible novel therapeutic targets.



# ABBREVIATIONS UTILISEES

---

---

- 5 mC** : 5 méthylcytosine
- ADN** : acide désoxyribonucléique
- DNMT** : méthyltransférase
- DR** : death receptor
- GST** : gène suppresseur de tumeur
- HDAC** : histone deacétylase
- INK** : inhibiteurs cyclines dépendantes
- M** : méthylé
- MBPs** : methyl-cytosine-binding proteins
- MSO** : méthylation-specific oligonucleotide
- MSRE** : méthylation-specific restriction enzyme
- Pb** : paires de bases
- PCR** : polymerase chain reaction
- PNET** : tumeur primitive neuroectodermique
- Rb** : rétinoblastome
- SNC** : système nerveux central
- TRD** : transcription repression domain
- U** : non méthylé



# SOMMAIRE

---

---

<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1. EPIGENETIQUE ET CANCER.....</b>	<b>3</b>
1 LA METHYLATION .....	4
1.1. <i>Au niveau des Cytosines dans les îlots CpG.....</i>	4
1.2. <i>Les méthyltransferases .....</i>	5
1.3. <i>La méthylation est associée à un remodelage de la chromatine.....</i>	6
2 LES METHODES D'ETUDE.....	7
2.1. <i>Analyse par digestion enzymatique et Southern Blot.....</i>	8
2.2. <i>Traitement bisulfite.....</i>	9
2.3. <i>PCR spécifique à la méthylation (MSP).....</i>	10
2.4. <i>Pyroséquençage.....</i>	13
2.5. <i>Microarray ou les Puces à ADN.....</i>	14
3 METHYLATION ET LES CELLULES NORMALES .....	16
4 STATUT DE LA METHYLATION DE L'ADN DANS LES CELLULES TUMORALES.....	18
4.1. <i>Hypométhylation .....</i>	18
4.2. <i>Hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeur .....</i>	19
4.3. <i>Gènes impliqués dans le cycle cellulaire.....</i>	21
4.3.1. <i>Le cycle cellulaire .....</i>	21
4.3.2. <i>RB1 (Retinoblastoma 1).....</i>	25
4.3.3. <i>p14ARF, p15INK4b, p16INK4a .....</i>	26
4.4. <i>Gènes impliqués dans l'apoptose .....</i>	27
4.4.1. <i>p53 et les voies d'apoptose .....</i>	27
4.4.2. <i>DAPK (Death associated protein kinase).....</i>	30
4.4.3. <i>RASSF1A (RAS association family 1 gene).....</i>	30
4.4.4. <i>CASP8, DRC1, DRC2, FLIP (voie TRAIL).....</i>	31
4.5. <i>Gènes de réparation de l'ADN.....</i>	32
4.5.1. <i>MGMT (O-6-méthylguanine-DNA méthyltransferase) .....</i>	32

4.6. Gènes impliqués dans l'angiogenèse, l'adhésion cellulaire et le remodelage tissulaire.....	33
4.6.1. THBS1 (Thrombospondine 1).....	33
4.6.2. APC (Adenomatosis polyposis coli).....	33
4.6.3. ECAD (E-cadherine).....	34
4.6.4. TIMP3 (Tissue inhibitor of metalloproteinase 3).....	35
4.7. Autres.....	36
4.7.1. RAR $\beta$ (Retinoic acid receptor).....	36
4.7.2. FHIT (Fragile Histidine Triad).....	36
4.7.3. BLU.....	37
4.7.4. INI1.....	38
4.7.5. NF2 (Neurofibromine 2).....	38
5 « METHYLOTYPE » OU PROFIL DE METHYLATION: MARQUEUR DIAGNOSTIQUE ET/OU PRONOSTIQUE.....	39
6 AGENTS DEMETHYLANTS.....	42
<b>CHAPITRE 2. LES CANCERS DE L'ENFANT.....</b>	<b>45</b>
1 GENERALITES.....	45
1.1. Epidémiologie et particularités biologiques.....	45
1.2. Méthylation et Tumeurs Solides de l'enfant.....	49
1.2.1. Les Rétinoblastomes.....	50
1.2.2. Les Néphroblastomes (Tumeur de Wilms).....	51
1.2.3. Les Ostéosarcomes.....	52
2 LES EPENDYMOMES.....	54
2.1. Aspects histologiques et cliniques.....	54
2.2. Aspects Cytogénétiques.....	56
2.2.1. Le chromosome 22.....	57
2.2.2. Le chromosome 6.....	57
2.2.3. Autres altérations chromosomiques.....	58
2.3. Aspects Epigénétiques.....	59
2.4. Travail de recherche.....	61
2.4.1. La méthylation des gènes suppresseurs dans les épendymomes intracrâniens de l'enfant.....	62
2.4.2. Dysfonction de la voie du p53 dans les épendymomes primitifs des enfants.....	76
2.5. Conclusion.....	89
3 LES NEUROBLASTOMES.....	91
3.1. Aspects histologiques et cliniques.....	91
3.2. Aspects Cytogénétiques.....	95
3.2.1. La ploïdie ou contenu ADN des cellules tumorales.....	96
3.2.2. L'amplification du proto-oncogène NMYC.....	96
3.2.3. Délétion du 1p.....	97
3.2.4. Trisomie du 17q.....	98
3.3. Aspects Epigénétiques.....	99
3.3.1. CASP8.....	99
3.3.2. DcR1, DcR2, TRAIL.....	100
3.3.3. RASSF1A.....	101

3.4. <i>Travail de recherche</i> .....	102
3.4.1. La méthylation de RASSF1A dans le cadre des neuroblastomes .....	103
3.4.2. Les neuroblastomes du nouveau né.....	125
3.5. <i>Conclusion</i> .....	135
<b>CHAPITRE 3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>137</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>143</b>
<b>ANNEXE I.....</b>	<b>169</b>
<b>ANNEXE II.....</b>	<b>171</b>





# FIGURES

---

---

Figure 1. Représentation schématique des voies biochimiques de la méthylation des cytosines, déméthylation et mutagenèse des cytosines en 5-méthylcytosine.....	5
Figure 2. Représentation schématique des différentes formes de chromatine : (A) chromatine transcriptionnellement active et (B) répression de la transcription par méthylation.....	7
Figure 3. Représentation schématique de l'analyse de la méthylation de l'ADN par Southern Blot.....	8
Figure 4. Diagramme schématique de la réaction de conversion par le bisulfite.....	10
Figure 5. Représentation schématique de l'analyse de la méthylation par MSP.....	11
Figure 6. Un exemple de pyroséquençage.....	13
Figure 7. Vue schématique de l'analyse de la méthylation par MSO.....	15
Figure 8. La carte du génome humain.....	21
Figure 9. Vue générale du cycle cellulaire.....	22
Figure 10. Mode d'action du complexe Cycline D / Cdk4 sur la protéine Rb.....	25
Figure 11. Organisation génomique des gènes du cluster 9p21 et description schématique des rôles des produits des gènes p14ARF, p15INK4B, et p16INK4A dans les voies anti tumorales de pRb et p53.....	27
Figure 12. Un modèle d'apoptose induite par p53.....	29
Figure 13. Voie de signalisation activée par TRAIL.....	32

Figure 14. A, description du profil d'hyperméthylation des gènes promoteurs dans les tumeurs humaines. B, distribution numérique des hyperméthylations des promoteurs selon les tumeurs et les gènes.....	40
Figure 15. Moyenne des années de vie perdues par personne qui décède d'un cancer, tous sexes et races confondus, 2002.....	46
Figure 16. Répartition des 12 principales tumeurs de l'enfance en Europe par groupe d'âge.....	47
Figure 17. Exemples d'évolution des taux de mortalité par cancer chez les enfants entre 5-9 ans des deux sexes aux USA. ....	49
Figure 18. Méthylation des gènes suppresseurs dans certains groupes de tumeur de l'enfance...	50
Figure 19. Épendymome. ....	55
Figure 20. Imagerie dans l'Épendymome. ....	56
Figure 21. Représentation schématique des variations de méthylation dans les tumeurs épendymales. ....	60
Figure 22. Analyse par MSP de la région promotrice du gène EP300.....	74
Figure 23. Test de la sensibilité de la détection de la méthylation du promoteur EP300 par MSP. ....	75
Figure 24. Les catégories des tumeurs neuroblastiques .....	92
Figure 25 - Primer, température d'annelisation et taille des produits PCR de MSP .....	169

# TABLEAUX

---

---

Tableau 1. Gènes fréquemment méthylés et épigénétiquement modifiés dans les tumeurs. ....	20
Tableau 2. Classification INSS .....	94
Tableau 3. Différentes approches thérapeutiques des neuroblastomes de l'enfant.....	95
Tableau 4. Groupes de risque de neuroblastomes selon les facteurs biologiques.....	98
Tableau 5. Publications et résultats sur l'es études épigénétiques des neuroblastomes.....	100



# AVANT-PROPOS

---

---

Depuis plus d'un siècle, le cancer semblait lié à des altérations génétiques, mais cela n'a été mis en évidence que depuis quelques dizaines d'années grâce à des études épidémiologiques (dont l'exemple classique est le rétinoblastome) et cytogénétiques. Ainsi la cancérisation est un processus multi étapes dans lequel des altérations somatiques ou héréditaires de certains gènes aboutissent à la sélection de clones plus robustes et agressifs, présentant un avantage prolifératif.

Deux classes de gènes – les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs – sont les cibles potentielles de ces altérations. Bien qu'une petite fraction des altérations génétiques connues dans les cancers soit constitutionnelle, la grande majorité des anomalies sont présentes uniquement dans la population de cancéreuses.

La délétion et la mutation d'un gène constituent des mécanismes simples d'inactivation. Un troisième type de mécanisme sont les translocations chromosomiques qui entraînent une interruption brutale du gène. Dans la majorité des cas, ces anomalies inactivatrices sont récessives. Il faut une inactivation des deux allèles pour que la perte de fonction puisse être complète et effective, c'est l'hypothèse de « two-hit » de Knudson (Knudson 2000). Plus récemment, il a été montré que des tumeurs peuvent avoir une mutation d'un des deux allèles et que l'autre allèle peut être inactivé par une modification épigénétique (Myöhänen, 1998). Au contraire des altérations génétiques, les modifications épigénétiques régulent l'activité du génome sans en changer la séquence d'ADN. L'hyperméthylation est le mécanisme d'inactivation épigénétique le plus étudié, avec pour intérêts potentiels la meilleure compréhension des étapes de la carcinogenèse et la mise au point de nouvelles thérapeutiques ciblées.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressés au profil de méthylation de deux tumeurs de l'enfance : les épendymomes et les neuroblastomes. Les résultats seront illustrés par deux publications et un article soumis, et seront discutés globalement.

# CHAPITRE 1.

## EPIGENETIQUE ET CANCER

---

Les modifications épigénétiques sont des modifications transmises au cours des multiplications cellulaires qui modulent l'activité du génome sans en affecter sa séquence nucléotidique (Torrisoni, 2003).

Les altérations génétiques et épigénétiques décrites dans les cancers finissent le plus souvent par entraîner un dysfonctionnement des voies qui régulent le cycle cellulaire et l'entrée en apoptose. Les altérations génétiques, comme les délétions ou les translocations, ont été largement étudiées dans la plupart des types histologiques de cancers. Un autre mécanisme de régulation a été plus récemment décrit et étudié: la méthylation de l'ADN au niveau des régions CpG. Il existe deux principales différences entre ces deux mécanismes. Premièrement, les événements génétiques sont responsables du dysfonctionnement de deux allèles dans le paradigme classique du « two-hit » pour la perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeur (Knudson, 2000). Chaque événement produit un niveau fixe de perte de fonction du gène, mais l'avantage sélectif ne se fait qu'après un deuxième événement sur l'autre allèle. Par contre, la perte de transcription liée à la méthylation aberrante de la région promotrice est liée à la densité de la méthylation à l'intérieur de la région et peut entraîner un avantage sélectif plus subtil que les mutations géniques pendant la progression tumorale. Deuxièmement, l'hyperméthylation et l'inhibition de la transcription associée sont potentiellement réversibles.



De plus, la méthylation de l'ADN qui entraîne l'inhibition de la transcription est associée à une modification de la chromatine.

Dans ce chapitre nous ferons une mise au point sur ce qui est actuellement connu sur la méthylation du point de vue biologique et ses applications possibles en clinique.

# 1.

## LA METHYLATION

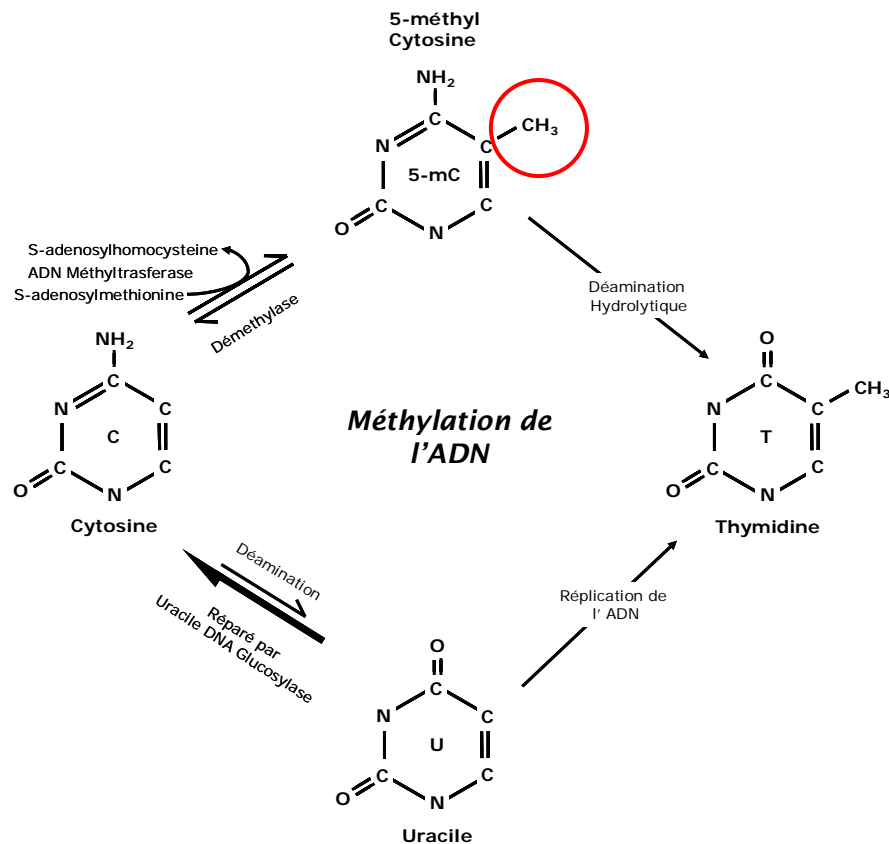
---

### 1.1. AU NIVEAU DES CYTOSINES DANS LES ILOTS CpG

L'information épigénétique contrôle l'utilisation des informations génétiques (comment, où et quand). Une des principales modifications épigénétiques chez le mammifère est la méthylation de l'ADN, c'est-à-dire addition covalente d'un groupement méthyl ( $\text{CH}_3$ ) à une position 5 d'une cytosine dans un dinucléotide CpG, qui représente une position relativement peu réactive (Figure 1). Le mécanisme catalytique des ADN (cytosine-5) – méthyltransférases (DNMTs) semble être similaire à celui des thymidylate synthétases, dans lequel un enzyme la cystéine thiolate établi une liaison covalente avec la position 6. Cette liaison repousse les électrons à la position 5 pour former un carbanion, qui peut, donc, réagir avec le groupe méthyl du N5, N10-méthylène-tétrahydrofolate. Après le transfert du groupe méthyl, la sortie d'un proton de la position 5 peut permettre la formation d'une double liaison 5-6 et libérer l'enzyme (Esteller, 2005).

En général, les dinucléotides CpG sont peu fréquents dans le génome des mammifères sauf dans des petites régions d'approximativement 1000 paires de base appelées « îlots » CpG. La plus grande partie des îlots CpG sont retrouvés dans la région promotrice de presque la moitié des gènes.

Figure 1. Représentation schématique des voies biochimiques de la méthylation des cytosines, déméthylation et mutagenèse des cytosines en 5-méthylcytosine.



D'après Singal and Ginder, 1999.

## 1.2. LES METHYLTRANSFERASES

Les enzymes responsables de la méthylation dans les cellules sont les ADN méthyltransférases (DNMTs). Elles ont été subdivisées en méthyltransférases de maintien (DNMT1) et *de novo* (DNMT3).

DNMT1 est la méthyltransférase la plus abondante dans les cellules somatiques et la première à avoir été décrite (Bestor, 1988). Elle a été souvent dite méthyltransférase « de maintien » parce qu'elle est l'enzyme responsable de la copie des patterns de méthylation après la répllication de l'ADN. Elle est nécessaire pour le développement embryonnaire et l'inactivation du chromosome X (Li, 1993).

Plus récemment la famille des méthyltransférases DNMT3 (DNMT3A et DNMT3B) a été caractérisée chez la souris et l'homme. Ces enzymes, présentes dans plusieurs espèces, sont

nécessaires à la méthylation « *de novo* » qui a lieu dans le génome après l'implantation embryonnaire et pour la méthylation *de novo* des séquences rétrovirales intégrées dans les cellules des souris ES (Okano, 1999).

Actuellement, il existe des résultats qui indiquent que les trois DNMTs coopèrent et possèdent aussi bien une action *de novo* comme de maintien *in vivo*. (Rhee I, 2004 ; Kim JD, 2002 ; Chen T, 2003). De plus, quelques études ont montré que DNMT1 peut agir comme une méthyltransférase « *de novo* » (Vertino, 1996) et que les DNMT3s peuvent aussi agir comme des enzymes « de maintien » (Rhee, 2000). Il est beaucoup plus probable que les trois enzymes possèdent des fonctions de méthylation « de maintien » et « *de novo* » et que, au moins dans les cellules somatiques, une méthyltransférase spécifique va être responsable de la méthylation d'une certaine région génomique à travers ses interactions avec d'autres protéines nucléaires ou avec des facteurs de liaison à l'ADN (Rountree, 2000, Bachman, 2001). Au niveau embryonnaire, chacune de ces protéines est vitale: la désactivation du gène correspondant dans la souris entraîne la mort de l'embryon ou la mort post-natale précoce (Okano, 1999 ; Li, 1992). Par ailleurs, il a été montré dans un modèle animal que DNMT1 est essentiel pour le développement de la polypose intestinale : la désactivation du gène de DNMT1 a nettement réduit l'incidence des tumeurs (Eads, 2002).

Des travaux récents ont démontré que les DNMTs peuvent aussi participer au remodelage de la chromatine par d'autres mécanismes que la méthylation. Chaque DNMTs peut interagir directement avec les histones déacétylases et peut donc les recruter au niveau des promoteurs des gènes.

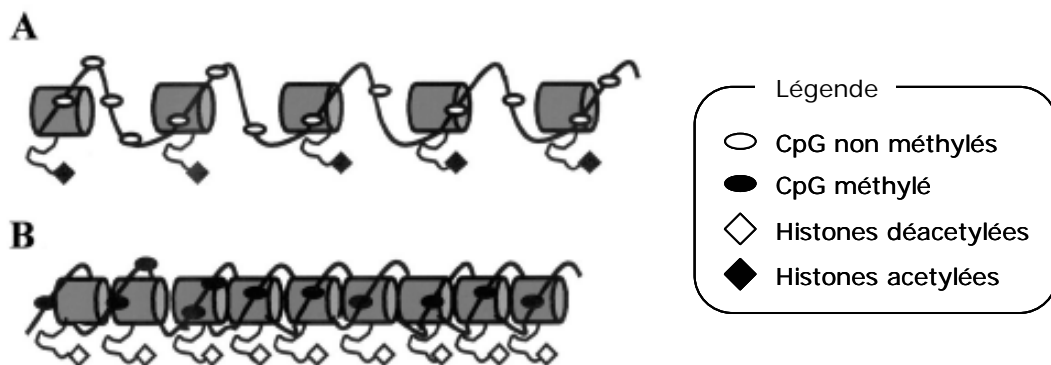
### **1.3. LA METHYLATION EST ASSOCIEE A UN REMODELAGE DE LA CHROMATINE**

La plus grande partie de notre génome est normalement sous forme d'une chromatine inactive du point de vue transcriptionnel, correspondant au type rencontré dans les régions d'hétéro chromatine péricentromérique. Ce type de chromatine est hautement méthylée.

Cet état de la chromatine fait intervenir des protéines capables de se lier aux cytosines méthylées (MBPs). La première de ces protéines, MeCP2, a été identifiée en 1992 (Lewis, 1992). Elle est divisée en deux domaines structuraux : un domaine de liaison avec une méthyl-CpG qui

reconnaît un dinucléotide CpG symétriquement méthylé (Wakefield, 1999), et un domaine d'inhibition de la transcription (TRD) qui interagit avec plusieurs protéines régulatrices (Nan, 1997). De plus, MeCP2 est capable de recruter les histones déacétylases (HDAC) (Jones, 1998 ; Nan, 1998). Cette observation a objectivé un mécanisme par lequel la méthylation pourrait entraîner la répression de la transcription et la modification structurale de la chromatine. En fait, la liaison des MBPs et de l'HDAC associées avec l'ADN méthylé entraînerait la déacétylation locale du centre des histones, en particulier des histones H3 et H4, aboutissant à un compactage de l'ADN et à un accès réduit des facteurs de transcription à leur site de liaison sur l'ADN (Robertson, 2000a) (Figure 2).

**Figure 2. Représentation schématique des différentes formes de chromatine : (A) chromatine transcriptionnellement active et (B) répression de la transcription par méthylation.**



## 2.

# LES METHODES D'ETUDE

Les techniques moléculaires utilisées pour la détection de la méthylation de l'ADN ont évoluées du Southern blot jusqu'à des méthodes plus sensibles comme la PCR quantitative ou plus globales comme les puces à méthylation. Nous décrirons dans ce chapitre les méthodes utilisées dans nos études en plus de deux autres méthodes disponibles actuellement (pyroséquençage et les puces à ADN) avec leurs avantages et inconvénients.

## 2.1. ANALYSE PAR DIGESTION ENZYMATIQUE ET SOUTHERN BLOT

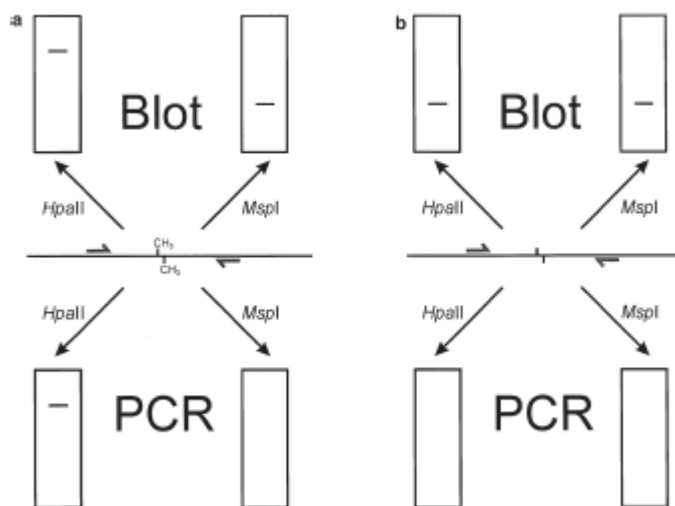
Une des premières méthodes décrite pour la recherche des 5méthylcytosines est l'utilisation de deux enzymes de restriction reconnaissant le même site mais qui sont sensibles ou non à la méthylation. Par exemple, Msp I coupe l'ADN au niveau de la séquence CCGG, quelque soit le statut de la cytosine interne alors que Hpa II coupera l'ADN seulement si la cytosine n'est pas méthylée. L'ADN est ensuite analysé par Southern blot (Figure 3). Quand des grandes quantités d'ADN sont disponibles, un Southern blot standard peut être réalisé. Si les bandes d'hybridation sont de même taille dans les deux digestions Hpa II et Msp I, cette base n'est pas méthylée. Par contre, si nous observons une bande plus grande avec HpaII qu'avec Msp I, le site est méthylé. Dans le cas d'une méthylation partielle, deux bandes de deux tailles distinctes seront détectées et leur intensité relative va être proportionnelle au degré de méthylation.

**Figure 3. Représentation schématique de l'analyse de la méthylation de l'ADN par Southern Blot**

(a) ADN méthylé

(b) ADN non méthylé.

*D'après Oakeley, 1999.*



Cette technique est intéressante pour étudier les grandes séries d'échantillons. Elle est relativement facile à mettre en œuvre et à interpréter et a un faible coût.

Cette méthode a certains points faibles. Clairement, cette procédure est applicable à un nombre limité de sites de méthylation, avec une quantité d'informations restreinte. De plus, un autre inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite une quantité importante d'ADN et donc ne peut pas s'appliquer à des prélèvements biologiques comme les biopsies ou le plasma.

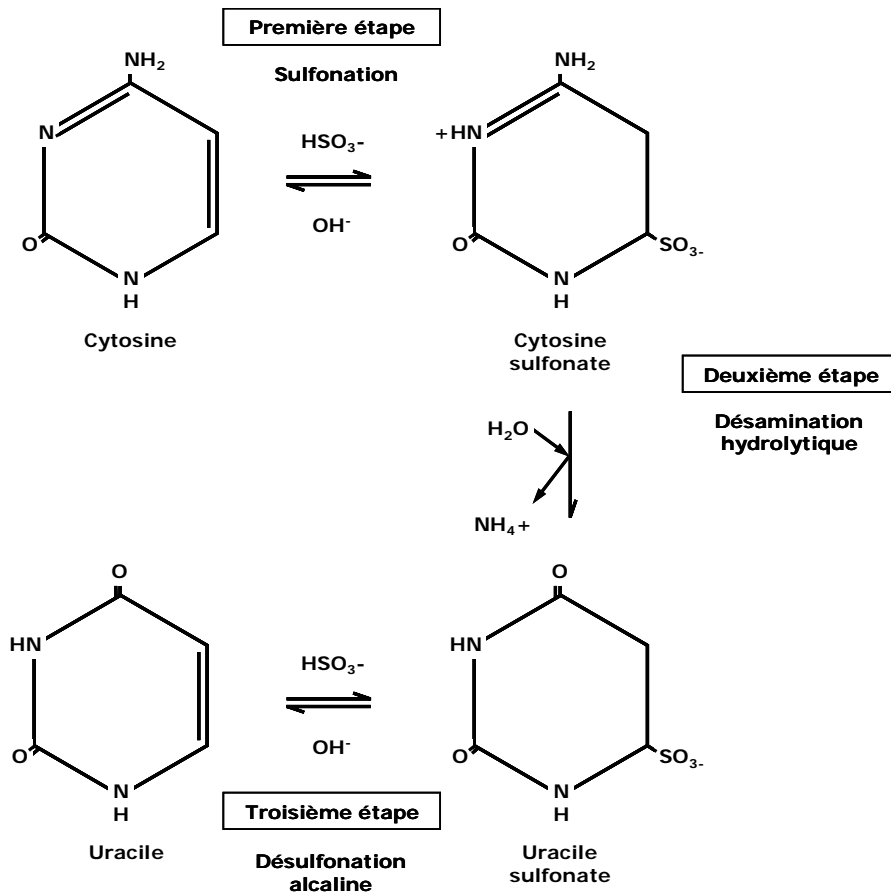
La sensibilité de cette technique peut être augmentée par l'utilisation d'une PCR dans le cas de petites quantités d'ADN. Nous avons appliqué cette dernière comme Aguirre (Aguirre, 2003) pour l'étude de la méthylation de p53 dans les épendymomes (publication numéro 2). L'ADN génomique a été digéré avec des enzymes de restriction sensibles à la méthylation *Hpa* II (pour les dinucléotides CpG) et *EcoR* II (pour les motifs CCWGG), et l'ADN digéré a été amplifié par PCR. Dans cette étude, les sites non méthylés sont digérés et ne sont pas amplifiés, pendant qu'un site méthylé empêche la digestion et entraîne une amplification. L'ADN méthylé in vitro avec *SssI* méthylase a été utilisé comme contrôle positif. Le contrôle de la digestion a été réalisé avec *Msp* I et *BstN* I, qui reconnaissent les mêmes sites que *Hpa* II et *EcoR* II, respectivement, mais qui sont insensibles à la méthylation.

## **2.2. TRAITEMENT BISULFITE**

Depuis la découverte du traitement de l'ADN au bisulfite de sodium, les possibilités d'analyse du profil de méthylation de l'ADN ont été augmentées. Il a surtout permis la détermination directe du statut de méthylation d'une partie définie de l'ADN. Cette méthode est basée sur la modification chimique des résidus des cytosines par le bisulfite de sodium (Frommer, 1992). Pendant la première étape de la réaction en présence de bisulfite de sodium, il se produit une sulfonation et une désamination des cytosines qui les transforment en uracile sulfonate. La désulfonation à un pH basique complète la conversion des cytosines en uracile. Cette désamination est beaucoup plus rapide quand les cytosines sont déméthylées que quand elles sont méthylées. Ainsi, dans les conditions de réaction choisies, les cytosines méthylées (C5-méthylcytosines) ne seront pas modifiées (Frommer, 1992). Actuellement, des kits commerciaux de modification d'ADN avec ce traitement sont disponibles (Qbiogene et Qiagen).

De cette façon, l'information épigénétique est transformée en une information de type polymorphisme de séquence (C ou T) qui est facilement accessible par de nombreuses technologies existantes, telles que la PCR ou le séquençage.

Figure 4. Diagramme schématique de la réaction de conversion par le bisulfite



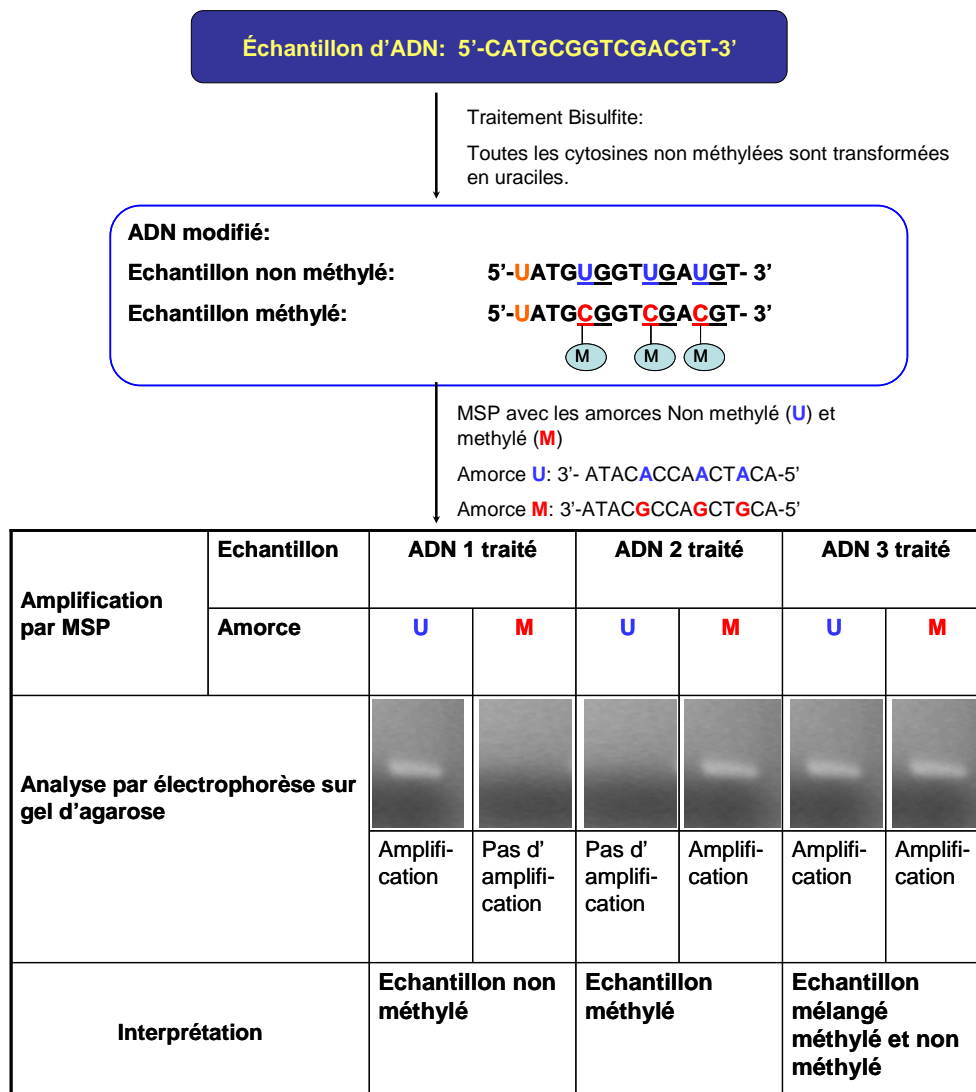
*D'après Clark et al, 1994*

### 2.3. PCR SPECIFIQUE A LA METHYLATION (MSP)

Avec l'utilisation large du traitement de l'ADN au bisulfite de sodium, associé à l'amplification par PCR (MSP pour méthylation specific PCR), tout laboratoire peut avoir l'opportunité d'étudier la méthylation de l'ADN, même en utilisant du matériel pathologique d'archive. Dans cette méthode, deux couples d'amorces sont choisis pour amplifier spécifiquement soit l'ADN méthylé (couple M) soit l'ADN non méthylé (couple U) (Figure 5). Trois facteurs doivent être considérés dans le choix des amorces. En premier lieu, l'ADN transformé par le bisulfite de sodium n'est plus auto-complémentaire. Les amorces qui sont

choisies pour l'amplification de brins sens d'une partie définie de l'ADN seront donc différentes de celles qui sont utilisées pour les brins anti-sens. Deuxièmement, les amorces doivent contenir plusieurs cytosines qui ne font pas partie de dinucléotides CpG dans la séquence originale, et qui sont, donc, transformées en uracile après le traitement. L'inclusion de ces bases dans les amorces aide à éviter l'amplification de l'ADN résiduel non transformé, et, donc, d'éviter les faux positifs. Troisièmement, les amorces doivent être choisies dans une région contenant plusieurs CpG dont une en 3' pour garantir la spécificité méthylé/non méthylé. Actuellement, il existe des logiciels qui aident dans la recherche des amorces. (METHPRIMER expliqué dans Li, 2002).

Figure 5. Représentation schématique de l'analyse de la méthylation par MSP.



En fait, cette méthode est beaucoup plus sensible que les analyses par Southern blot, facilitant la détection de petits nombres d'allèles méthylés et l'étude à partir de petites quantités d'ADN aussi bien que de matériels en paraffine. La seule technique qui peut faire une analyse



plus directe que la MSP des sites CpG dans une région définie est le séquençage génomique, mais la MSP est beaucoup plus simple et plus rapide. Cet argument fait de la MSP une méthode plus adéquate pour l'analyse de grandes séries (Herman, 1996).

Nous avons utilisé la MSP pour étudier deux groupes de tumeurs de l'enfant: les neuroblastomes et les épendymomes. Les amorces et les conditions de PCR sont décrites dans la publication numéro 1 ("Méthylation of *RASSF1A* and TRAIL pathway related genes is frequent in childhood intracranial ependymomas and benign choroid plexus papilloma"), dans l'article soumis ("Méthylation of tumor suppressor genes in neuroblastome: The *RASSF1A* gene is almost always méthylated in primary tumors").

Une autre méthode basée sur le traitement bisulfite suivi d'une PCR est appelée MethyLight. Cette méthode utilise la PCR quantitative en temps réel pour analyser quantitativement la méthylation d'une région donnée avec une très grande sensibilité. Cette technique est basée sur l'analyse avec des sondes de type taqman. Pour un gène donné un couple d'amorce permettant d'amplifier aussi bien l'ADN méthylé que l'ADN non méthylé ainsi que deux sondes taqman marquées avec deux fluorochromes distincts et s'hybridant soit à l'ADN méthylé soit à l'ADN non méthylé sont choisis. Pendant l'amplification, le fluorochrome dans la sonde est libéré dans une fréquence qui est proportionnelle à la concentration initiale d'ADN. Pour une mesure correcte, des contrôles doivent être inclus en même temps dans chaque plaque analysée, incluant les contrôles pour corriger les différences de quantité d'ADN, et vérifier si la réaction bisulfite est complète, et aussi pour quantifier les mesures de méthylation (Eads, 2000). Deux groupes d'amorces de PCR et sondes doivent être utilisés en parallèle : un groupe « méthylé » pour le gène d'intérêt et un groupe « référence » pour le gène de la  $\beta$ -actine servant à normaliser la quantité d'ADN. Les mesures relatives de la méthylation de l'ADN sont obtenues par la comparaison des échantillons avec de l'ADN humain méthylé artificiellement. Le pourcentage des molécules méthylées pour un gène donné est calculé en rapportant la relation entre le niveau de fluorescence pour un gène/niveau de fluorescence de la  $\beta$ -actine de l'échantillon à analyser au niveau de fluorescence du GENE/niveau de fluorescence de la  $\beta$ -Actine de l'ADN traité par SssI (artificiellement méthylé) et en multipliant par 100. Les valeurs générées par cette méthode ne sont donc pas de valeurs absolues, mais relatives. L'analyse par MethyLight est compatible avec l'étude de l'ADN en quantités et qualités variables, et a été utilisée dans l'étude des tissus micro disséqués en paraffine avec succès. La PCR en temps réel a des avantages comme la rapidité, la sensibilité et le potentiel d'automatisation et le fait d'être quantitatif. Elle ne permet pas plus que la MSP de connaître le statut d'un CpG particulier.

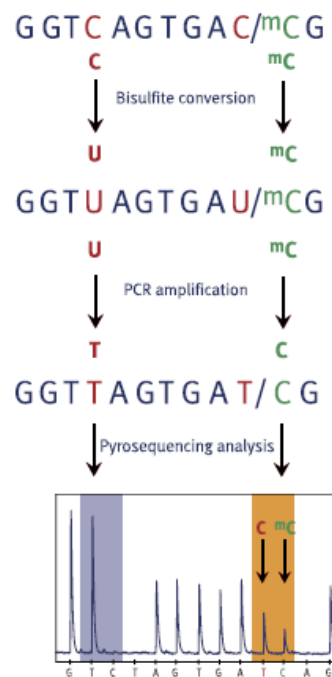
## 2.4. PYROSEQUENÇAGE

Afin de dépasser les problèmes de faux positifs et de gain dans les données quantitatives de méthylation, le pyroséquençage a été développé depuis 2003 dans lequel 4 à 25 di nucléotides CpG d'une certaine région sont individuellement analysés.

Cette analyse utilise d'abord le traitement standard par le bisulfite suivi d'une PCR (Figure 6).

### Figure 6. Un exemple de pyroséquençage.

Les cytosines non méthylées (**C**) sont mesurées par le pyroséquençage comme la quantité relative de **T** dans un site CpG, et les cytosines méthylées (**mC**) sont mesurées comme la quantité relative de **C** dans un site CpG.



D'après: <http://www.Biotagebio.com>  
Pyrosequencing TM

Cette méthode est basée sur la chimio luminescence des réactions enzymatiques, qui sont déclenchées quand il y a reconnaissance d'un événement moléculaire. Essentiellement, cette méthode permet le séquençage d'un ADN monocaténaire par la synthèse de la branche complémentaire. Chaque fois qu'un nucléotide est incorporé dans la cascade des réactions

enzymatiques, un signal lumineux est envoyé (Colella, 2003; Tost, 2003). L'intensité de la lumière émise est proportionnelle à la quantité incorporée d'un nucléotide, par exemple cytosine.

Le pyroséquençage du produit de la PCR gère une représentation pictoriale de la séquence de nucléotides, dit Pyrogram TM. Le Pyrogram montre la séquence de nucléotides (comme la séquence des pics) et la représentation quantitative des événements d'incorporation (comme la hauteur du pic). Le degré de méthylation est donc calculé par la hauteur des pics C et T.

Le pyroséquençage, cependant, n'a pas une aussi bonne sensibilité que la MSP parce que les primers sont spécifiquement désignés pour éviter les di nucléotides CpG dans leur séquence pour pouvoir détecter la quantité de méthylation dans un échantillon de façon quantitative (Shawn, 2006). Ainsi, la PMA n'est pas la méthode idéale du point de vue de la sensibilité pour détecter les ADN tumoraux méthylés en présence d'une grande quantité d'ADN normal non méthylé.

Un autre inconvénient est que cette technique demande un appareillage sophistiqué et cher.

## **2.5. MICROARRAY OU LES PUCES A ADN**

L'analyse par microarray a été initialement décrite comme un moyen d'analyser l'expression de plusieurs gènes simultanément. Les chercheurs ont commencé à utiliser cette technique pour trouver de nouvelles sous classes de maladies et identifier des marqueurs biologiques associés à ces maladies.

Cette technique utilise des sondes spécifiques à un gène. Ces sondes sont mises dans une matrice d'un substrat inerte et les taux d'expression d'un échantillon sont évalués.

Plusieurs méthodes basées sur le « microarray » ont été récemment développées pour déterminer la localisation et fréquence de 5mC dans les génomes (van Steensel, 2003). Nous décrirons deux d'entre elles : l'analyse avec enzyme de restriction spécifique à la méthylation (MSRE) et la puce à ADN d'oligonucléotides spécifiques à la méthylation (MSO).

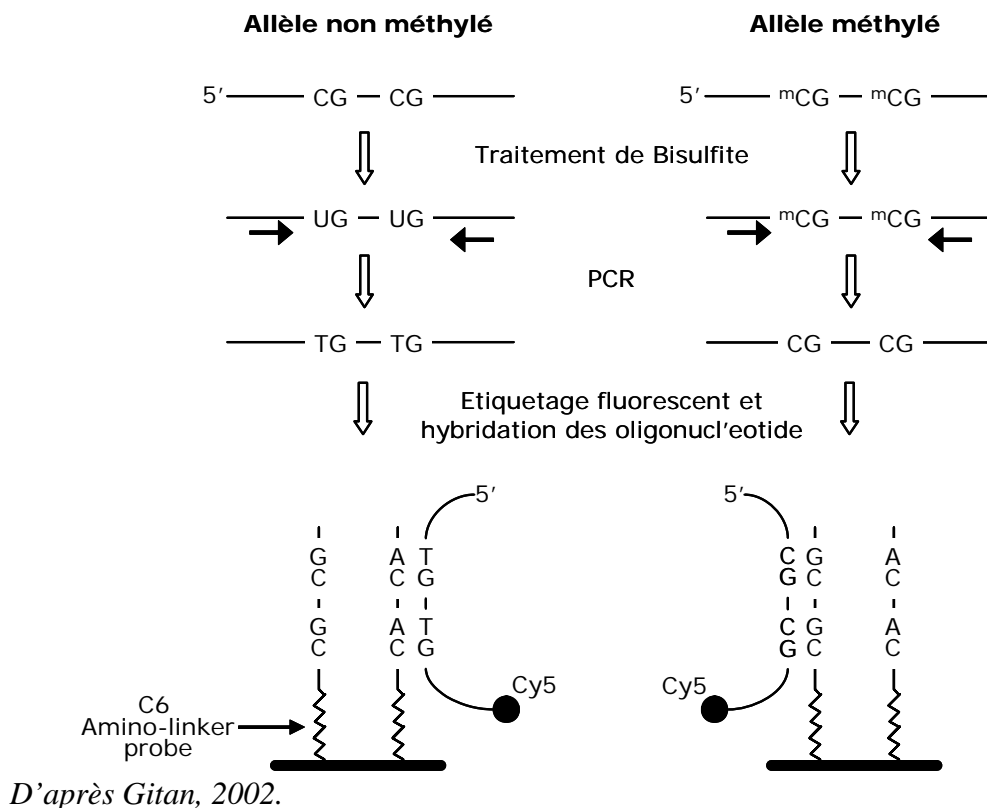
Le premier type de méthode utilise les endonucléases de restriction sensibles à la méthylation. Par exemple, l'enzyme McrBC coupe l'ADN méthylé et pas le non méthylé. Le

fractionnement en tailles différentes d'ADN digéré de cette manière avec cette enzyme va entraîner une sous-représentation des séquences méthylées d'ADN dans la fraction de haut poids moléculaires. L'hybridation « microarray » peut donc, être utilisée pour identifier les séquences qui étaient méthylées (Lippman, 2004).

Une autre méthode complètement différente (MSO) utilise le traitement de l'ADN génomique avec le bisulfite de sodium. Les sondes sont des oligonucléotides qui peuvent discriminer les dinucléotides transformés et les non transformés, c'est à dire, entre les cytosines méthylées ou non méthylées d'un site spécifique. Des oligonucleotides spécifiques d'une région sont utilisés pour quantifier la modification C-T induite par le bisulfite dans cette région (Adorjan, 2002 ; Gitan, 2002) (Figure 7).

**Figure 7. Vue schématique de l'analyse de la méthylation par MSO.**

L'ADN génomique est traité avec le bisulfite et amplifié par PCR pour une région CpG d'intérêt. Le produit amplifié est étiqueté avec un colorant fluorescent Cy5 et hybridé à une sonde oligonucléotide liée à la surface d'une vitre. À gauche, une sonde oligonucléotide est désignée pour former une liaison parfaite avec une cible d'ADN portant un allèle non méthylé. À droite, la sonde est désignée pour se lier parfaitement avec une cible d'ADN méthylé.



Le grand avantage de cette méthode est la possibilité de tester le statut de méthylation de plusieurs gènes en même temps. Un des « inconvénients » est que les données résultantes des analyses des puces à ADN doivent être normalisées puis analysées statistiquement. Cette analyse doit être faite avec précaution et rigueur car elle peut avoir un effet sur les résultats. En effet, différentes analyses statistiques peuvent être appliquées aux mêmes données et entraîner différents groupes de gènes significatifs (Quackenbush, 2006). L'autre problème est la difficulté de l'utilisation de cette méthode en routine dans des petits échantillons vu la nécessité d'importantes quantités d'ADN. Elle reste une méthode moins sensible que la MSP.

### 3.

## **METHYLATION ET LES CELLULES NORMALES**

---

Initialement, le concept que les 5 méthylcytosines (5mC) n'avaient aucune signification essentielle dans la structure de l'ADN et dans son fonctionnement a été largement accepté. L'objet classique d'étude de la génétique traditionnelle, la Drosophile, a largement participé à ce postulat. En effet, les 5mCs dans le génome de cet insecte ont échappé à la détection pendant très longtemps et, il a été donc admis par certains investigateurs que cette modification de l'ADN ne jouait pas un rôle significatif dans la vie des organismes eucaryotes. Actuellement, il a été clairement démontré que l'ADN dans les Drosophiles est méthylé et que cette modification est importante dans le développement de l'insecte normal et une activité méthyltransférase a été détectée dans les stades précoces du développement de cet insecte (Gowher, 2000 ; Lyko, 2000).

Les 5mCs dans le tissu humain normal constituent 0.75-1% de toutes les bases nucléotides, et, approximativement, 4 à 6% de toutes les cytosines sont méthylées dans l'ADN normal humain (Paz, 2002). Les dinucléotides CpG ne sont pas distribués d'une façon aléatoire ; les régions riches en CpG, connues comme les îlots CpG, sont généralement non méthylées dans tous les tissus normaux et fréquemment localisées dans la région 5'-terminale (promoteur, région

non traduite, et exon 1) d'une série de gènes. Nous pouvons trouver certaines cytosines méthylées normalement dans le génome et elles jouent un rôle important dans la réparation de l'ADN, de la stabilité du génome et de la structure de la chromatine, aussi bien que dans l'inactivation du chromosome X chez les femmes (Esteller, 2002).

Quarante pour cent du génome des mammifères est constitué des éléments parasites de l'ADN ou retrotransposons, comme des rétrovirus endogènes. Ces séquences (par exemple L1 ou ALU) sont riches en CpG et sont majoritairement inactivées par méthylation (Yoder, 1997 ; Colot, 1999). Ceci limite leur expression et maintient l'intégrité du génome (Torrisani, 2003). Il a été, donc, proposé que la méthylation puisse jouer un rôle de défense du génome en empêchant l'expression de ces éléments et en limitant la diffusion rétrovirale dans le génome (Yoder, 1997).

Une autre cible pour la méthylation est l'ADN satellite. Les séquences satellites sont des séquences d'ADN relativement courtes (jusqu'à 200 pb), hautement répétitives et non codantes qui forment des blocs localisés dans les régions hétérochromatiques des chromosomes (Ehrlich, 2003 ; Widschwendter, 2004).

La méthylation de l'ADN joue aussi un rôle dans le maintien de l'empreinte génomique parentale. C'est une modification épigénétique spécifique des gamètes qui maintient l'expression inégale des allèles maternels et paternels d'un nombre restreint de gènes dans les tissus d'un organisme adulte (Kisseljova, 2005).

Enfin, la régulation de l'inactivation des gènes liés au chromosome X est également dépendante de la méthylation de l'ADN. Ceci est primordial car le chromosome X est plus long et porte plus des gènes non liés au sexe que le chromosome Y. Sans régulation, les femmes auraient potentiellement deux fois plus de produits de ces gènes que les hommes (Torrisani, 2003).

## 4.

# STATUT DE LA METHYLATION DE L'ADN DANS LES CELLULES TUMORALES

---

### 4.1. HYPOMETHYLATION

Dans la majorité des cas le terme « hypométhylation se réfère à un état relatif qui représente un changement par rapport au taux « normal » de méthylation. L'hypométhylation est utilisée pour décrire aussi bien une réduction globale de la méthylation dans le génome entier (hypométhylation globale) ou une déméthylation relative localisée dans différentes régions du génome, comme les régions promotrices des proto-oncogènes ou les séquences répétées normalement hautement méthylées. L'hypométhylation globale est observée dans deux situations importantes : le vieillissement et les cancers (Dunn, 2003). Depuis longtemps, une hypométhylation globale a été observée dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales, dans différents types de néoplasies humaines ou animales. (Gamma-Sosa, 1983 ; Kim, 1994). Elle se caractérise par une baisse de 20 à 60 % de la teneur en 5mC. Cette hypométhylation globale contribue à la tumorigenèse à travers trois mécanismes : la réactivation des transposons, l'instabilité des chromosomes et la perte d'empreinte parentale.

Bien que les mécanismes responsables de cette hypométhylation ne soient pas clairement définis, les conséquences cellulaires sont multiples. Comme décrit avant, une fonction primaire de la méthylation de l'ADN est la suppression de la transcription et l'expansion des transposons (Yodes, 1997). La fonction d'un gène pourrait être altérée non seulement par l'insertion directe d'un nouvel élément transposable dans un exon codant, mais aussi dans un intron et provoquer sa transcription, ou par la génération d'un transcrit anti-sens si l'élément est intégré dans une orientation anti-sens (Robertson, 2000a).

La méthylation de l'ADN peut également agir en stabilisant le génome, en inhibant la recombinaison homologe entre les séquences répétées (Colot, 1999). Plusieurs études ont

maintenant clairement démontré que les éléments répétitifs sont hypométhylés dans les tumeurs et que le degré d'hypométhylation est corrélé avec l'instabilité du génome et la progression de la maladie (Narayan, 1998 ; Qu, 1999). L'hypométhylation des différentes séquences satellites a été fréquemment observée (40-90%) dans plusieurs types de tumeur (Narayan, 1998 ; Ehrlich, 2003 ; Wong, 2001). Dans les tumeurs ovariennes, l'hypométhylation de l'ADN satellite augmente avec la progression tumorale, et elle peut être considérée comme un possible marqueur de mauvais pronostic (Widschwendter, 2004 ; Qu, 1999).

La perte de la méthylation des éléments répétitifs peut avoir lieu tôt au cours de la progression tumorale et peut prédisposer la cellule aux réarrangements du génome via la recombinaison mitotique. La recombinaison pourrait, à son tour, soit inactiver les gènes critiques dans la régulation de la croissance soit, via le gain et/ou la perte d'un bras d'un chromosome, induire l'expression inappropriée d'un gène suppresseur de tumeur ou d'un oncogène.

L'hypométhylation peut aussi, dans les cancers, avoir lieu dans une région promotrice CpG d'un gène spécifique, par exemple un proto-oncogène, entraînant la surexpression et résultant dans une augmentation de la prolifération cellulaire. L'hypométhylation semble, donc, être corrélée à la progression vers le cancer et offre des mécanismes potentiels pour expliquer la carcinogenèse (Dunn, 2003).

## **4.2. HYPERMETHYLATION DES GENES SUPPRESSEURS DE TUMEUR**

Dans les cancers, l'hyperméthylation des régions promotrices est l'altération épigénétique la plus souvent décrite ; elle est retrouvée dans presque tous les types de néoplasies et est associée à l'inhibition de la transcription de gènes suppresseurs de tumeurs conférant ainsi un avantage aux cellules néoplasiques (Jones, 2002). Les gènes méthylés appartiennent à des voies différentes dans chaque type de cancer et peuvent être des marqueurs de détection très sensibles dans pratiquement tous les types de tumeurs (Esteller, 2001).



**Tableau 1. Gènes fréquemment méthylés et épigénétiquement modifiés dans les tumeurs.**

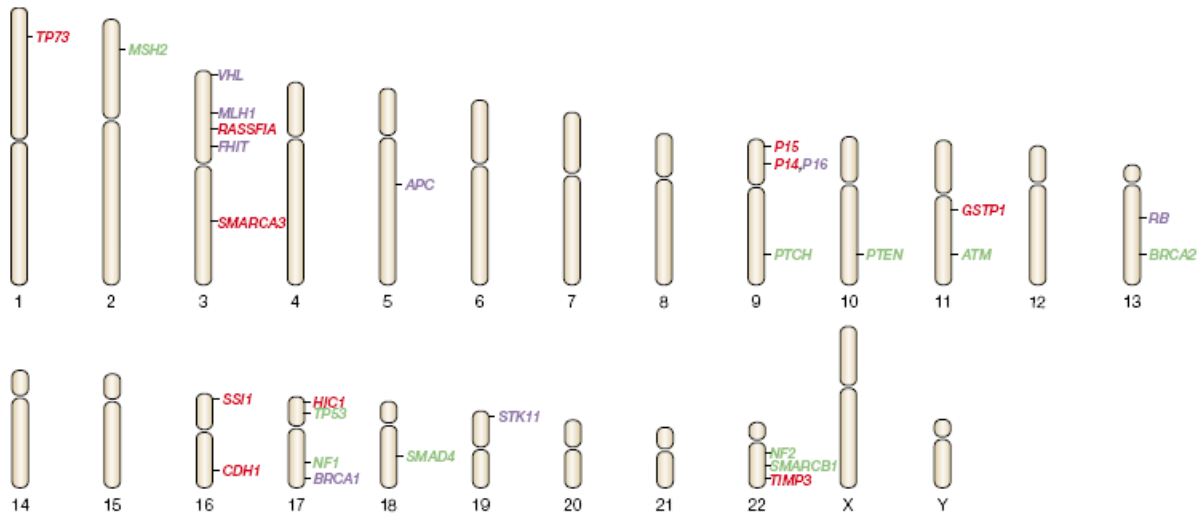
Cancer-associated pathway	Gene
Cell cycle	Retinoblastoma gene ( <i>Rb</i> ) <i>p16<sup>INK4a</sup></i> <i>p15<sup>INK4b</sup></i> <i>14-3-3σ</i> <i>p14<sup>ARF</sup></i>
Signal transduction	<i>RASSF1</i> <i>LKB1/STK11</i> <i>APC</i>
Apoptosis	Death-associated protein kinase gene ( <i>DAPK</i> ) Caspase-8 gene
DNA repair	O <sup>6</sup> -methylguanine-DNA methyltransferase gene ( <i>MGMT</i> ) <i>MLH1</i> <i>BRCA1</i>
Carcinogen metabolism	Glutathione S-transferase P1 gene ( <i>GSTP1</i> )
Hormonal response	Oestrogen receptor gene Progesterone receptor gene Retinoic acid receptor β2 gene ( <i>RAR-β2</i> )
Senescence	<i>TERT</i> <i>TERC</i>
Invasion/metastasis	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 gene ( <i>TIMP-3</i> ) E-cadherin gene von Hippel-Lindau gene ( <i>VHL</i> )

Une des premières descriptions associe l'hyperméthylation du gène RB1 avec des cas familiaux de rétinoblastome unilatéral (Greger, 1989). Puis, il a été montré que quand un allèle de p16<sup>ink4a</sup> est muté et l'autre méthylé, il y a perte de fonction de ce gène intervenant dans le cycle cellulaire (Herman, 1995). Depuis il a été accepté que l'inactivation des gènes suppresseurs par hyperméthylation puisse être un mécanisme fréquent dans les cancers humains où elle peut agir comme un événement primaire d'inactivation contribuant directement à la tumorigénèse.

Une autre observation importante est que les gènes hyperméthylés sont fréquemment localisés dans les régions où les délétions chromosomiques sont fréquentes (Figure 8).

**Figure 8. La carte du génome humain.**

Gènes qui sont fréquemment mutés ou hyperméthylés dans le cancer. Quelques gènes qui sont connus pour être fréquemment hyperméthylés dans un ou plusieurs types de cancer, et des gènes qui sont fréquemment mutés sont représentés en rouge et en vert respectivement. Les gènes qui présentent les deux altérations sont représentés en violet.



*D'après Jones and Baylin, 2002.*

### 4.3. GENES IMPLIQUES DANS LE CYCLE CELLULAIRE

Les gènes suppresseurs de tumeurs (GST) comme DAPK, p16, p73, Rb, et autres, fonctionnent en promouvant l'apoptose ou en supprimant la croissance cellulaire. Ils sont souvent supprimés, mutés ou hyperméthylés dans les cellules tumorales. Nous allons rapporter en détails les gènes suppresseurs de tumeur auxquels nous nous sommes plus particulièrement intéressés.

Avant de décrire la localisation, la fonction et ce que nous connaissons sur la méthylation de chaque gène qui nous avons étudié, nous ferons ici un bref rappel sur le cycle cellulaire.

#### 4.3.1. Le cycle cellulaire

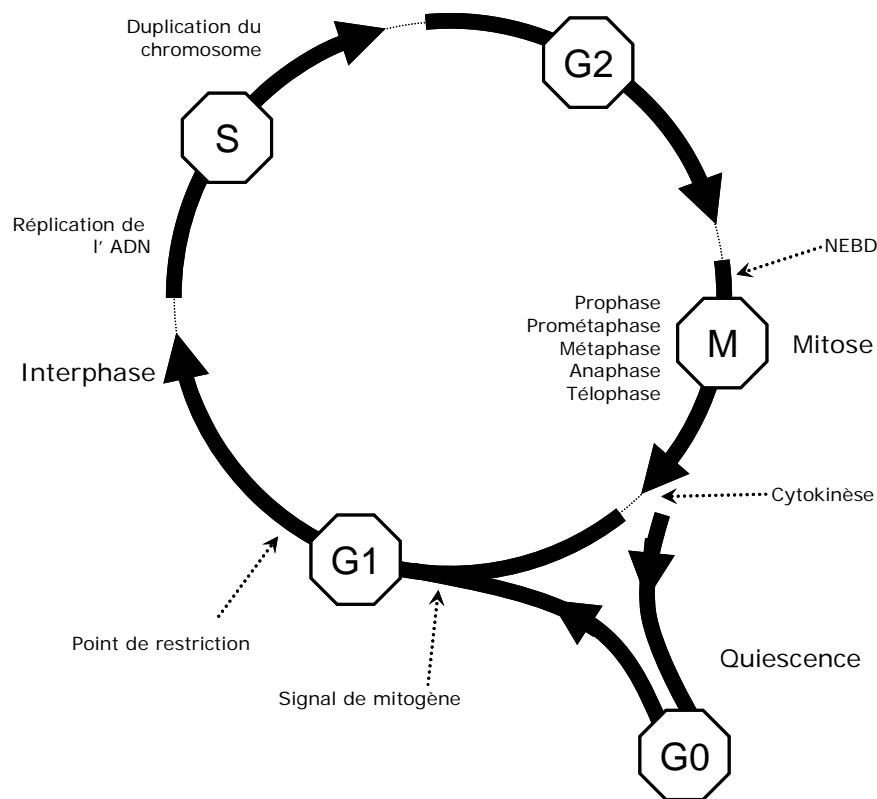
Tous les organismes sont constitués de cellules qui se multiplient par division cellulaire. Ce processus est extrêmement complexe. En fait, les événements doivent avoir lieu d'une façon régulière, précise et avec une synchronisation parfaite pour assurer que chaque cellule fille reçoive la bonne quantité d'ADN et soit capable, à la fin de la division cellulaire, de former une nouvelle cellule indépendante et fonctionnelle.

Nous discuterons spécifiquement du cycle cellulaire des mammifères. Après la division cellulaire (i.e. mitose) la cellule fille peut soit continuer à se diviser, soit cesser cette croissance active. Dans le deuxième cas, la cellule entre dans un état de quiescence appelé phase G0. La plus grande partie des nos cellules sont en G0, mais sous certaines conditions les cellules peuvent sortir de G0 et recommencer à se diviser.

En fait, seulement un petit pourcentage des cellules de notre corps se multiplie. Dans certains tissus comme la moelle osseuse, la peau et l'intestin, la division cellulaire continue à avoir lieu, pour remplacer constamment les cellules en fin de vie.

La réplication de l'ADN est réalisée dans un moment précis appelé phase de synthèse ou phase S. La phase S dans les cellules des mammifères dure normalement 6 à 8 heures. La période de la mitose, appelée phase M, dure moins d'une heure, et inclut le processus de condensation chromosomique, de cassure de la membrane nucléaire, d'alignement des chromosomes dans l'appareil mitotique, de ségrégation des deux groupes d'ADN condensés aux pôles opposés de la cellule, de formation de deux membranes nucléaires autour des chromosomes, de décondensation des chromosomes, et de séparation en deux cellules filles.

Figure 9. Vue générale du cycle cellulaire



D'après Meijer, 2005.

La phase S ne suit pas directement la phase M. Il existe une période après la phase M pendant laquelle la cellule qui vient de se diviser se prépare pour la phase S. Cette période est appelée la première période « Gap » ou phase G1. De la même manière, après la fin de la synthèse d'ADN et de la réplication des chromosomes pendant la phase S, il existe une longue période, souvent de 4 à 5 heures. Cette période après la phase S et avant la phase M est la seconde période « Gap » du cycle cellulaire, ou phase G2. Le temps pendant lequel la cellule n'est pas en phase M est parfois aussi appelé interphase (Figure 9) (revue par Meijer, 2005).

La progression du cycle cellulaire repose sur l'activation d'un facteur de transcription, la protéine E2F. En se fixant sur l'ADN, E2F active la plupart des gènes nécessaires à la phase S. L'activité d'E2F est étroitement régulée au cours du cycle cellulaire. La protéine est maintenue sous une forme inactive au cours de la phase G1. Lorsque la cellule approche de la transition G1/S, E2F devient actif et peut induire la transcription des gènes nécessaires à la réplication de l'ADN.

Parallèlement à l'activateur E2F, le cycle cellulaire est également contrôlé par la protéine Rb. Le gène de susceptibilité au rétinoblastome (RB1) est localisé sur le bras long du chromosome 13 (13q14) et représente l'exemple classique d'un gène suppresseur de tumeur. Il code pour une nucléoprotéine de plus de 200 kb (Rb) qui joue un rôle fondamental dans les complexes de régulation de la transition G1-S du cycle cellulaire, comme décrit ci-dessous. L'activité du complexe de kinases cycline D1/cycline-dépendante est contrôlée par des protéines inhibitrices comme p16 (CDKN2A), donc la perte de la fonction de p16 ou RB1 peut résulter en une dérégulation de la prolifération cellulaire (Medema et al, 1995).

Rb fut initialement découvert comme étant à l'origine d'une tumeur de l'œil chez l'enfant, le rétinoblastome. La mutation des deux allèles de Rb suffit pour entraîner une prolifération anarchique conduisant au développement tumoral. Ces résultats ont alors rapidement montré que Rb était un inhibiteur important du cycle cellulaire, la disparition de son activité entraînant une forte dérégulation de la prolifération. Rb possède la propriété essentielle de pouvoir se fixer sur le facteur de transcription E2F et de bloquer ainsi la progression de la phase S (Harbour, 2000). Cette interaction explique les effets inhibiteurs de Rb sur le cycle cellulaire (revue par Nevins, 1998).

L'activité de Rb varie au cours du cycle cellulaire car cette protéine perd ses propriétés inhibitrices à la transition G1/S. Rb est une protéine qui présente de nombreux sites de phosphorylations qui correspondent pour la plupart à des serines ou des thréonines présentées

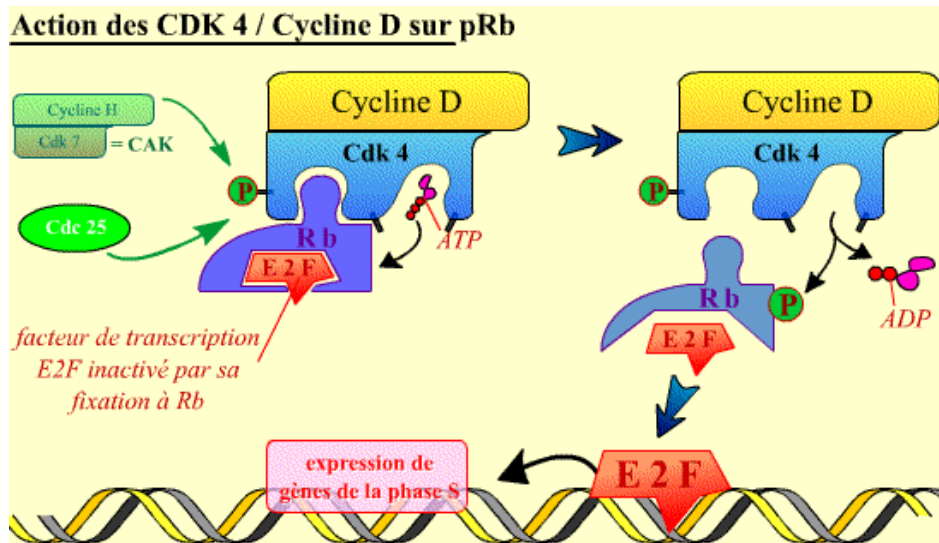
sous la forme de sites consensus de phosphorylations pour les cdk. Lorsque la phosphorylation de Rb varie, sa capacité à interagir avec le facteur de transcription E2F varie également. Trois étapes doivent être distinguées: en début de la phase G1, Rb n'est pas phosphorylée et une phosphorylation partielle a lieu au cours de cette phase. Sous ces deux formes, Rb conserve ses propriétés inhibitrices et est toujours capable d'interagir avec E2F. La progression vers la phase S repose donc sur des phosphorylations séquentielles de Rb, la réplication de l'ADN n'est permise que lorsque Rb est complètement phosphorylé, c'est à dire lorsqu'il libère E2F (revue par Sherr, 2000, Flemington, 1993). L'étude de Rb montre que sa phosphorylation suit l'apparition des complexes cycline/ckd. Nous pouvons également observer que la cycline D puis la cycline E interagit avec Rb au cours de la phase G1. Dans un premier temps, seule cdk4 associée à cycline D phosphoryle Rb. Cette phosphorylation entraîne un changement de conformation de Rb qui permet à la cycline E de se fixer sur Rb. En absence de phosphorylation, le site de contact de la cycline E semble être inaccessible (Harbour, 1999). Une fois fixé, le complexe cycline E/ckd2 phosphoryle une deuxième fois Rb, sur des sites différents de ceux utilisés par cdk4. Afin de conserver cette inhibition, un des rôles de cycline A/ckd2 puis de cycline B/ckd1 sera de maintenir la phosphorylation de Rb (revue par Coqueret, 2002).

Rb n'a pas pour seul rôle de bloquer l'accès d'E2F au complexe d'initiation de la transcription car il est en fait également capable de moduler l'état d'ouverture de la chromatine, une des étapes essentielles de la régulation de la transcription. Rb inhibe activement la transcription (Bremner, 1995) à travers le recrutement des histones déacétylases (HDAC) (Brehm, 1998), le remodelage des complexes méthylases Swi/Snf (Zhang, 2000) et la méthylation des histones (Nielsen, 2001). Les altérations de la structure de la chromatine maintiennent la répression de la transcription des gènes de phase S pendant G1, afin que ces promoteurs soient seulement accessibles au moment de la transition G1/S. Lorsque E2F est inactive, Rb ne peut plus bloquer cet accès (Rb ne peut pas interagir avec l'ADN seul), ces gènes sont alors probablement toujours actifs, cette activation aboutissant alors au développement tumoral observe chez les souris E2F<sup>-/-</sup>.

Une classe d'inhibiteurs de cdk, appelés protéines INK4 (à cause de leur capacité d'inhiber cdk4), cible les kinases dépendantes de la cycline D (Sherr, 1995) et assure l'arrêt du cycle cellulaire (Sherr, 1999). Cette capacité des protéines INK4 dépend de la présence fonctionnelle de la protéine Rb, faisant supposer que du fait de l'inhibition des kinases dépendantes de cycline D, Rb reste hypophosphorilée et capable d'empêcher la transcription de gène dans la phase S (Lukas, 1995).

**Figure 10. Mode d'action du complexe Cycline D / Cdk4 sur la protéine Rb.**

Une fois activé, le complexe Cycline D / Cdk4 peut phosphoryler la protéine Rb. Ceci permet alors la libération par cette dernière du facteur de transcription E2F. Une fois libéré, E2F se fixe sur l'ADN, activant l'expression de gènes codant pour des protéines nécessaires au déroulement de la phase S.



D'après le site

<http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiersBM/cyclecellVIE/08G1.htm#action4d>

Par Marie-Claude Lebart, Jean Mariani, Gilles Furelaud  
site Université Pierre et Marie Curie.

**4.3.2. RB1 (Retinoblastoma 1)**

La perte de la fonction de RB1 a été décrite dans plusieurs types de tumeurs et une association significative a été observée entre la perte de l'hétérozygotie (LOH) de RB1 et l'absence d'expression de Rb. Cette dernière a été observée dans 25-45% des glioblastomes et dans 25% des astrocytomes anaplasiques, aussi bien que dans les carcinomes de la vessie et les cancers pulmonaires neuroendocriniens malins (Ishikawa et al, 1991; Hogg et al, 1993; Xu et al, 1993 ; Ichimura et al, 1996). Les analyses par séquençage des 27 exons du gène RB1 dans les néoplasies porteuses d'une LOH ont montré un taux faible (5-12%) d'inactivation par mutations. Ces observations suggèrent l'existence d'un autre mécanisme d'inhibition de RB1 comme, par exemple, l'hyperméthylation de son promoteur (Ishikawa et al, 1991; Ichimura et al, 1996; Tsuzuki et al, 1996). L'hyperméthylation de RB1 a été déjà décrite dans 20 % des adénomes de

l'hypophyse (Bello et al, 2006), 5 % des liposarcomes (Takahira, 2005) et dans 6.6 % des rétinoblastomes (Tosi, 2005; Joseph, 2004).

### **4.3.3. p14ARF, p15INK4b, p16INK4a**

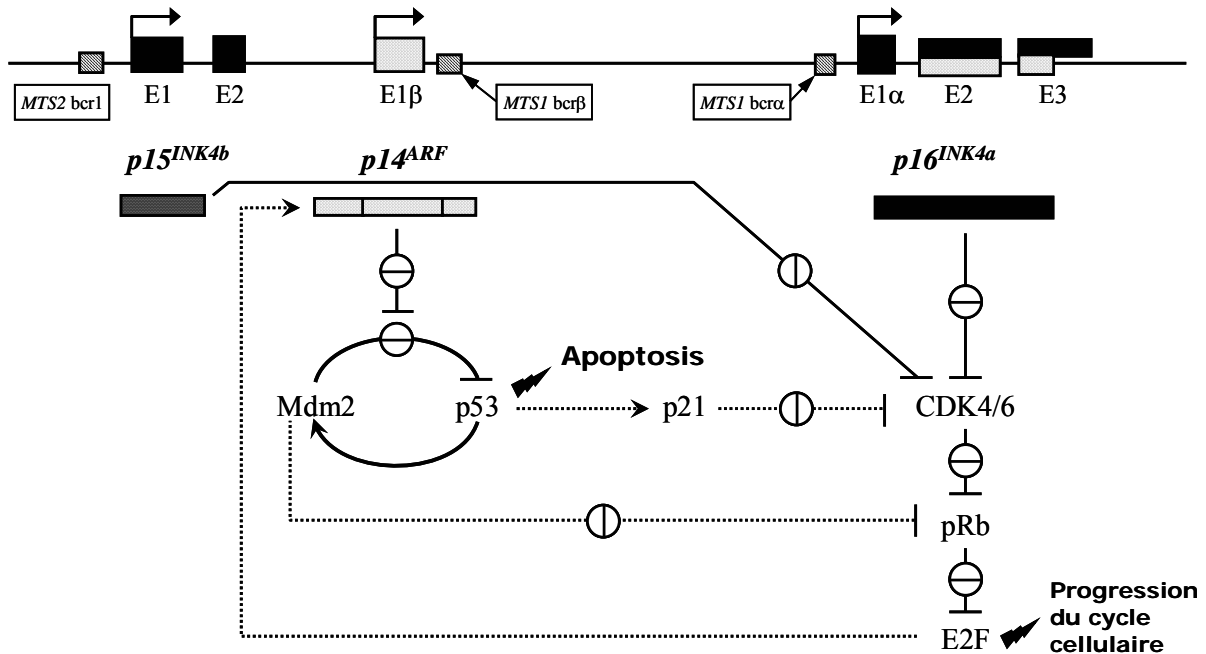
Le locus *INK4a/ARF* (*9p21*) code pour deux protéines distinctes, p16<sup>INK4a</sup> et p14<sup>ARF</sup>, qui sont transcrites par deux promoteurs localisés dans les premiers exons alternatifs 1 $\alpha$  et 1 $\beta$  (Mao et al, 1995). Les codons d'initiation dans les exons 1 $\alpha$  et 1 $\beta$  sont situés dans deux cadres de lecture différents entraînant la production de deux protéines totalement distinctes (Quelle, 1995). p16<sup>INK4a</sup> et p14<sup>ARF</sup> sont des GSTs qui modulent l'activité des voies pRb et p53 en réponse aux signaux prolifératifs.

p16<sup>INK4a</sup> et p15<sup>INK4b</sup> sont deux membres de la famille des inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes (INK). Ils inhibent les complexes cycline D-CDK4/6 et donc préviennent la phosphorylation de Rb pendant la phase G1. (Serrano, 1993).

La protéine p14<sup>ARF</sup> induit l'arrêt du cycle cellulaire (phases G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub>) (Quelle et al, 1995) p53-dépendante (Kamijo et al, 1997). p14<sup>ARF</sup> interagit avec l'oncoprotéine Mdm2 et inhibe l'exportation nucléaire de Mdm2 (Tao, 1999). Cette action empêche l'association Mdm2-p53 et bloque la dégradation Mdm2-induite de p53; de ce fait la protéine p53 est stabilisée (Zhang, 1998). Ainsi, p14<sup>ARF</sup> limite la croissance cellulaire par l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose induits par p53 (Pomerantz, 1998, Hannon, 1994; Jones, 1996) (Figure 11).

L'hyperméthylation du promoteur des gènes p16<sup>INK4a</sup> et p14<sup>ARF</sup> a été rapportée dans les cancers du colon, de la vessie, du sein, et du poumon et aussi dans les gliomes, les mélanomes, les leucémies, et les lymphomes (Herman, 1995; Nakamura, 1999). L'inactivation du gène p15<sup>INK4B</sup> est associée à une perte de contrôle du cycle cellulaire et une prolifération aberrant des cellules tumorales. L'hyperméthylation de ce gène est souvent observée dans les leucémies (Kamb, 1994, Kusy, 2004).

Figure 11. Organisation génomique des gènes du cluster 9p21 et description schématique des rôles des produits des gènes p14ARF, p15INK4B, et p16INK4A dans les voies anti tumorales de pRb et p53.



D'après Xing et al, 1999.

#### 4.4. GENES IMPLIQUES DANS L'APOPTOSE

Avant de décrire la méthylation des gènes étudiés liés à l'apoptose, nous ferons ici un bref rappel sur les voies de régulation de p53 et l'apoptose dans l'intention de permettre une meilleure compréhension et vision globale des relations entre ces gènes et la mort cellulaire programmée.

##### 4.4.1. p53 et les voies d'apoptose

Une des voies de contrôle du cycle cellulaire est celle dépendante de p53. p53 est un facteur transcriptionnel qui inhibe la croissance cellulaire en réponse aux lésions de l'ADN, à l'activation des oncogènes, à l'hypoxie et à la perte des contacts cellulaires normaux (Giaccia, 1998). Il limite la croissance cellulaire par l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire dans les phases G1 et/ou G2, de la sénescence ou de l'apoptose (Haupt, 2003). En fait, p53 joue un rôle



central dans la réponse au stress et empêche la tumorigenèse. Les critères exacts qui influencent p53 à induire l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose ne sont que partiellement compris, il s'agit du taux d'expression de p53, du type de signal de stress, du type cellulaire et du contexte cellulaire au moment de l'exposition au stress (revue par Balint, 2001).

La façon par laquelle p53 induit l'apoptose a été l'objet de multiples études. Plusieurs publications ont récemment décrit l'importance de la régulation de la transcription de p53 dans les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. p53 est aussi capable d'induire l'apoptose par un mécanisme apoptotique indépendant de la transcription (Caelles, 1994, revue par Dlamini, 2004). Nous décrirons plus en détails ce qui est connu du rôle de p53 dans les deux voies d'apoptose. En fait, environ 50% des cancers humains présentent des mutations du gène p53 ; dans la plus grande partie des cas restants de cancers, l'activité de p53 est également compromise par un mécanisme alternatif (Vogelstein, 2000).

Ces dernières années, il est devenu clair que la plus grande partie des formes d'apoptose inclut l'activation en cascade d'une classe particulière de protéases, les caspases. Deux voies majeures assurent l'exécution de l'apoptose comme décrit ci-dessous: la 'voie extrinsèque', qui est initiée par les récepteurs membranaires de mort cellulaire (DRs), et la 'voie intrinsèque', basée sur l'activité mitochondriale qui, à travers la libération du cytochrome *c* et d'autres médiateurs, entraîne l'activation des caspases (Peter, 2004).

### ***1. La voie intrinsèque***

La voie intrinsèque est, à son tour, activée en réponse à une lésion de l'ADN et est associée à une dépoliarisation de la mitochondrie et libération du cytochrome *c* dans le cytoplasme.

La voie intrinsèque de l'apoptose est dominée par la famille de protéines Bcl-2, qui gouverne la libération du cytochrome *c* de la mitochondrie (Cory, 2002). La famille Bcl-2 est divisible en trois classes : les protéines pro-survie, pour lesquelles les membres sont les plus structurellement similaires à Bcl-2, comme Bcl-X<sub>L</sub>; les protéines pro-apoptotiques, Bax et Bak, qui sont structurellement similaires à Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> et sont antagonistes de leur fonctions pro-survie ; et les protéines pro-apoptotiques 'BH3-only' (Bouillet, 2002).

Bax a été le premier membre de ce groupe pour lequel il a été démontré une induction par p53. En réponse à un stress d'activation, Bax forme un homodimère et libère le cytochrome *c* de

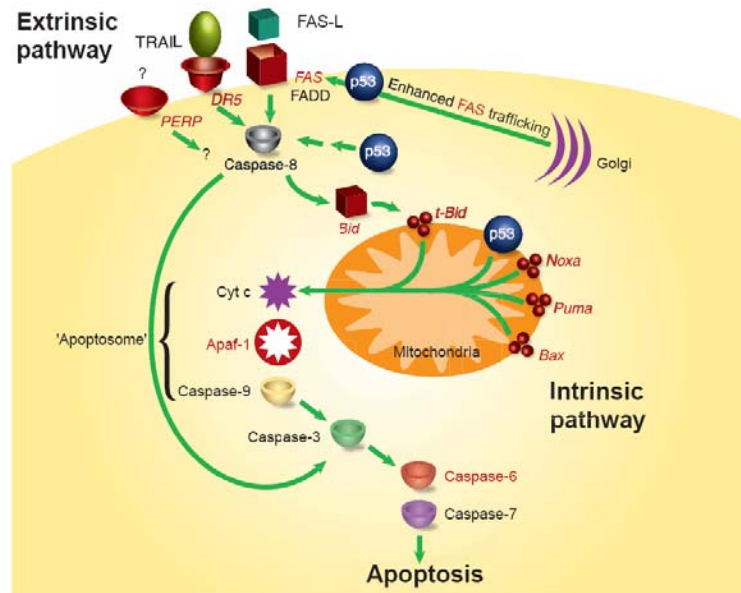
la mitochondrie (Skulachev, 1998), qui entraîne l'activation de caspase-9 (revue in Adams, 1998).

## II. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque implique l'activation de récepteurs particuliers de mort cellulaire. p53 peut activer la voie extrinsèque de l'apoptose par l'induction des gènes codant trois protéines transmembranaires : Fas, DR et PERP (Haupt, 2003). p53 induit l'expression mARN de Fas par son lien avec des éléments dans le promoteur et premier intron du gène Fas (Muller, 1998). Cette induction a lieu en réponse à l'irradiation gamma, et semble être spécifique à quelques tissus comme la rate, le rein et le poumon (Bouvard, 2000). En plus de stimuler la transcription de Fas, p53 surexprimé peut aussi augmenter les taux des récepteurs Fas sur la surface cellulaire en promouvant la venue des récepteurs Fas du corpuscule de Golgi (Bennett, 1998), ce qui peut permettre à p53 de sensibiliser rapidement les cellules à l'apoptose induite par Fas avant que l'effet dépendant de la transcription ait lieu.

**Figure 12. Un modèle d'apoptose induite par p53.**

Ce modèle montre la relation de p53 dans les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. Les gènes cibles de p53 sont présentés en rouge. La convergence des deux voies par Bid est montrée.



*D'après Haupt et al, 2003.*

Le deuxième récepteur induit par p53 est DR5/KILLER, le récepteur qui contient un domaine de liaison pour le ligand inducteur d'apoptose lié à TNF (TRAIL). DR5 est induit par

p53 en réponse aux lésions de l'ADN (Wu, 1997) et promeut la mort cellulaire par caspase-8 (revue par Ashkenazi, 1998).

#### **4.4.2. DAPK (Death associated protein kinase)**

DAPK est une serine/threonine protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante de 160-kDa localisée sur le locus 9q34 et joue un rôle dans les voies de l'apoptose induite par de l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , le TGF- $\beta$ , et Fas. L'hyperméthylation de DAPK est une altération épigénétique importante dans les cancers du poumon, de l'œsophage, de la tête et du cou, de la prostate, de la vessie et de l'estomac. Elle a aussi été démontrée dans plusieurs proliférations malignes des cellules B comme le lymphome de cellules B, le myélome multiple et le lymphome de Burkitt. (Ashok et al, 2003)

#### **4.4.3. RASSF1A (RAS association family 1 gene)**

Le gène RASSF1 est localisé sur le locus 3p21.3. Il produit plusieurs isoformes protéiques, les plus fréquentes étant RASSF1A et RASSF1C. Ces protéines RASSF1A peuvent induire l'arrêt du cycle cellulaire et participent à la mort cellulaire par apoptose (Shivakumar, 2002 ; Kiel, 2005, Song, 2004). Elles induisent l'apoptose par son interaction avec la kinase pro-apoptotique MST1. RASSF1A règle l'intégrité cellulaire et la progression mitotique à travers son interaction avec les microtubules et CDC20. RASSF1A inhibe également l'accumulation de cycline D1 et peut bloquer le cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S. Il semble donc que RASSF1A a le potentiel de servir comme pont entre plusieurs voies de signalisation critiques. Par exemple, RASSF1A se lie au facteur de transcription p120 E4F qui forme un complexe avec les suppresseurs de tumeur Rb et p53 (Fenton, 2004). RASSF1A a, donc, le potentiel d'influencer la fonction de deux des plus importants suppresseurs de tumeurs de la cellule.

La perte d'expression de RASSF1A est un événement fréquent dans les cancers humains primitifs (Agathangelou, 2001; Harada, 2002; Dammann, 2001), et la réexpression de RASSF1A dans les lignées cellulaires humaines inhibe le phénotype tumoral (Dammann, 2000; Kuzmin, 2002). De plus, des études avec les souris "knock-out" montrent que celles-ci sont plus susceptibles de développer une tumeur (Tommasi, 2005). Ces observations ont aboutit à la conclusion que RASSF1A est un gène suppresseur de tumeur très important. La diminution de l'expression de RASSF1A dans les tumeurs humaines se fait par la méthylation de son promoteur (Agathangelou, 2001; Harada, 2002; Dammann, 2001). Celle-ci est fréquemment

retrouvée dans les cancers du sein (40–50%), prostate et ovaires (de 30 à 50%), dans les cancers du poumon (de 30 à 80%) et à plus de 90% dans les cancers rénaux (Agathangelou, 2005).

La compréhension des anomalies moléculaires et de la fonction de RASSF1A dans le cancer pourrait entraîner l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et le développement de nouvelles drogues anti cancéreuses (Pfeifer, 2005).

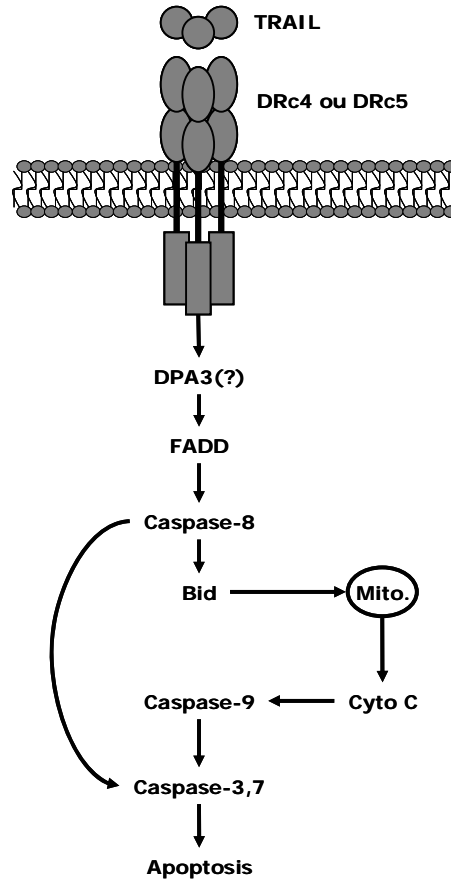
#### **4.4.4. CASP8, DRC1, DRC2, FLIP (voie TRAIL)**

L'apoptose est un processus hautement contrôlé, et plusieurs inhibiteurs de ce processus sont connus et interfèrent à différents niveaux des voies extrinsèques et intrinsèques. Vu que plusieurs maladies sont caractérisées par une dérégulation de l'apoptose par les DRs, l'identification des inhibiteurs cellulaires responsables du blocage de la voie extrinsèque est très importante. Juste après l'identification des caspases 8 et 10, une autre protéine a été découverte par son homologie avec le pro domaine de caspase-8/10. Ce gène a été cloné et est appelé FLIP. L'idée que FLIP soit un inhibiteur de la voie extrinsèque a été accepté rapidement et appuyé par les résultats des études avec les souris déficientes en FLIP qui étaient plus sensibles à l'apoptose induite par les DRs (Yeh, 2000). Caspase-8 joue un rôle critique dans les signaux de mort cellulaire induits par le facteur de nécrose tumoral (TNF) lié à l'apoptose, TRAIL. C'est un agent potentiellement anti cancéreux qui a été identifié au milieu des années 90s (Figure 13).

Des nombreuses cellules issues de tumeurs très agressives, sont résistantes à l'apoptose induite par TRAIL et certaines cellules cancéreuses qui étaient initialement sensibles à l'apoptose induite par TRAIL peuvent devenir résistantes après l'exposition répétée à la chimiothérapie. La compréhension des mécanismes sous-jacents d'une telle résistance et les stratégies pour la dépasser sont importantes pour l'utilisation de TRAIL dans les traitements des cancers. La résistance à TRAIL peut avoir lieu dans différents points de la voie de l'apoptose. Des dysfonctionnements des récepteurs de mort cellulaire (DRs) due à des mutations peuvent entraîner une résistance. Les protéines Fas (FADD) et caspase-8 sont essentielles pour la liaison des complexes inducteurs de la mort cellulaire, et des défauts dans une de ces molécules peuvent induire une résistance à TRAIL. (Zhang, 2005)

La méthylation des gènes de la voie TRAIL (Caspase 8, DcR1, DcR2, FLIP) a été décrite dans des tumeurs des ovaires (Horak, 2005), des neuroblastomes (van Noesel, 2003) et des cancers pulmonaires à petites cellules (Hopkins-Donaldson, 2003).

Figure 13. Voie de signalisation activée par TRAIL.



*D'après Y. Kim and D.W. Seol, 2003.*

## 4.5. GENES DE REPARATION DE L'ADN

### 4.5.1. MGMT (O-6-méthylguanine-DNA méthyltransferase)

Le gène MGMT est localisé dans la région 10q26. Le gène est exprimé dans toutes les cellules normales humaines et de souris et catalyse le transfert d'un groupe méthyl/alkyl d'O6-méthylGuanine sur une cystéine de sa propre molécule, réparant de cette façon les lésions de l'ADN en une seule réaction (Olsson, 1980). En effet, MGMT: (1) agit seul sans avoir besoin d'une autre protéine ou cofacteur ; (2) transfère le groupe alkyl à un résidu cystéine interne, ayant ainsi une action de transférase et d'accepteur du groupement alkyl; (3) s'inactive après avoir reçu le groupe alkyl de la guanine ; (4) se répare d'une façon stœchiométrique (Liu, 2006).

Des évidences suggèrent que MGMT est un des gènes suppresseurs de tumeur le plus important. En effet, la perte de fonction de MGMT occasionne, des mutations qui favorisent le développement tumoral. Les souris déficientes en MGMT, par exemple, sont hypersensibles aux agents alkylants, induisant une tumorigenèse (Iwakuma, 1997). L'hyperméthylation aberrante de la région promotrice de MGMT est corrélée à la perte de mRNA et/ ou des protéines, et aussi à des pertes de fonctions dans plusieurs tumeurs primitives humaines (Esteller, 1999; Koga, 2005). La méthylation aberrante de MGMT a été détectée dans le sérum, les crachats, et les lavages broncho-alvéolaires des patients porteurs d'un cancer du poumon (Fujiwara, 2005).

La méthylation de MGMT est un facteur de mauvais pronostic, mais est aussi un bon marqueur prédictif de la réponse à la chimiothérapie avec des agents alkylants (Soejima, 2005).

## **4.6. GENES IMPLIQUES DANS L'ANGIOGENESE, L'ADHESION CELLULAIRE ET LE REMODELAGE TISSULAIRE**

### **4.6.1. THBS1 (Thrombospondine 1)**

La thrombospondine-1 (THBS1), une protéine associée à la matrice cellulaire, est un fort inhibiteur de l'angiogénèse. Elle est capable de bloquer la migration des cellules endothéliales après plusieurs stimuli angiogéniques, d'entraîner l'apoptose cellulaire et de prévenir la neovascularisation de la cornée chez la souris (Bornstein, 1995, Good, 1990). Les mécanismes de contrôle de l'expression de THBS1 ne sont pas très bien connus, mais la méthylation de son promoteur semble jouer un rôle. L'hyperméthylation de sa région promotrice a été récemment impliquée dans l'inactivation transcriptionnelle de THBS1 dans les glioblastomes (Lil, 1999). Dans le cas des neuroblastomes, une corrélation nette entre la méthylation du promoteur THBS1 et la non expression du gène n'a pas pu être confirmée, mais le traitement des lignées de neuroblastomes THBS1 négatives avec un agent déméthylant (5-AZA-dCeoxyctidine) a restauré la transcription de THBS1 (Yang, 2003).

### **4.6.2. APC (Adenomatosis polyposis coli)**

Le gène APC code pour une protéine nucléo-cytoplasmique de 300 kDa qui régule les activités de la  $\beta$ -caténine et l'adhérence cellulaire E-cadherine dépendante, l'organisation du cytosquelette, l'apoptose et le contrôle du cycle cellulaire pour le passage de G1 en phase S (Sieber, 2000). APC interagit avec des molécules intra cytoplasmiques importantes, comme

l'axine, GSK-3 $\beta$ , et la  $\beta$ -caténine pour former un complexe tétramérique. La phosphorylation des deux, APC et axine, par GSK-3b augmente la liaison de la  $\beta$ -caténine au complexe APC-axine (Ikeda, 2000). APC ne se lie pas seulement à la  $\beta$ -caténine mais, en collaboration avec GSK3 $\beta$  et d'autres protéines, il semble régler la quantité de  $\beta$ -caténine dans le cytosol. La  $\beta$ -caténine est une protéine cellulaire abondante, identifiée pour son rôle dans les liaisons intercellulaire via E-cadherine. Malgré le fait que l'activité adhésive d'E-cadherine (ECAD) soit localisée dans le domaine extracellulaire, le fonctionnement d'ECAD dépend de sa capacité à former un complexe avec le groupe de protéines du cytosol appelées caténines (Conacci-Sorrell, 2002).  $\beta$ - et  $\gamma$ -caténine se lient mutuellement et exclusivement au domaine cytoplasmique d'ECAD et agissent dans la liaison du complexe à l'actine du cytosquelette. En plus,  $\beta$ - et  $\gamma$ -caténine jouent un rôle important dans les voies de signalisation Wnt (Baker, 2000; Bienz, 2000). En réponse à des signaux de Wnt, la  $\beta$ -caténine n'est pas phosphorylée, elle s'accumule dans le cytoplasme et est ensuite transloquée au noyau, où elle forme un complexe avec des facteurs de transcription pour réguler l'expression de gènes dont certains sont liés à l'oncogénèse. Les défauts dans les voies de signalisation Wnt jouent un rôle important dans plusieurs cancers humains (Sarrío, 2003). Nous savons actuellement que  $\beta$ -caténine agit aussi comme un co-activateur avec les facteurs de transcription de type Lef (lymphoid enhancer factor) -Tcf (T-cell factor), en stimulant la transcription de plusieurs gènes, comme la cycline D1 et c-myc (Sieber, 2000).

Dans les cancers colorectaux, où le gène APC muté génère une protéine tronquée, incapable de se lier et de coordonner la régulation de la  $\beta$ -caténine, cette dernière s'accumule dans la cellule, forme des complexes avec des facteurs de transcription de la famille Tcf ou Lef et se transloque au noyau. Une fois dans le noyau, la  $\beta$ -caténine fonctionne comme un co-activateur de la transcription.

Actuellement il existe plusieurs études qui ont démontré que l'hyperméthylation d'APC est un mécanisme important de réduction de la fonction d'APC et qu'elle joue un rôle important dans la carcinogénèse, surtout des tumeurs gastriques et intestinales (Esteller, 2000b ; Brucher, 2006).

#### **4.6.3. ECAD (E-cadherine)**

La glycoprotéine transmembranaire E-cadherine, qui est en partie responsable de l'adhésion intercellulaire dépendante du calcium dans le tissu épithélial, joue un rôle important dans l'embryogénèse, la polarisation, la différenciation et la migration cellulaire (Takeichi,

1991). Cette adhésion est essentielle pour le maintien de l'épithélium normal et sa dérégulation est liée à la malignité (Wijnhoven, 2000). En fait, le gène codant par l'E-cadherine (*CDH1*) est considéré comme un suppresseur de tumeur et il y a été démontré que sa perte promouvait l'invasion tumorale et les métastases dans plusieurs modèles de cancers (Christofori, 1999). Il existe plusieurs mécanismes pour l'expression anormale d'ECAD dans les cancers (Berx, 2001). La perte allélique du locus *CDH1* (16q22.1) est une des altérations cytogénétiques les plus fréquentes dans les cancers du sein (Shen, 2000), alors que les mutations somatiques d'ECAD sont fréquemment retrouvées uniquement dans les types histologiques lobulaires (Lei, 2002). La répression de la transcription d'ECAD par hyperméthylation de son promoteur a été décrite dans les cancers du sein et dans des lignées cellulaires (Yoshiura, 1995). Quelques études *in vitro* dans les lignées cellulaires de cancer du sein ont démontrée que la diminution d'ECAD peut augmenter les signalements oncogéniques de  $\beta$ -caténine (Brown, 2001).

#### **4.6.4. TIMP3 (Tissue inhibitor of metalloproteinase 3)**

Les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases (TIMP) et les métalloprotéases de matrice (MMP) sont des éléments clés dans la formation, le remodelage et la dégradation de la matrice extracellulaire. Les MMPs sont des enzymes protéiques dépendantes du zinc qui sont capables de digérer la membrane basale et la plus grande partie des composants de la matrice extracellulaire. L'expression ainsi que l'activation des MMPs sont physiologiquement régulées pour empêcher la destruction non contrôlée des tissus, mais cette régulation est modifiée ou lésée dans les processus pathologique comme les cancers. Les mécanismes qui contrôlent l'action de MMPs incluent leur inhibition par les TIMP. Le gène TIMP3 est aussi un inhibiteur de l'angiogenèse et l'altération de son expression est associée à une neovascularisation et des cancers invasifs (Bachman, 1999).

La méthylation anormale de TIMP3 a été décrite dans les ostéosarcomes (Hou, 2006) et dans les tumeurs invasives du sein où elle a été liée au stade clinique, à la présence des métastases, à la surexpression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone ainsi qu'à la surexpression de l'oncogène et c-erbB2. (Lui, 2005)



## **4.7. AUTRES**

### **4.7.1. RAR $\beta$ (Retinoic acid receptor)**

Les rétinoïdes sont des analogues synthétiques et naturels de la vitamine A qui exercent des effets importants dans la croissance et la différenciation de plusieurs types cellulaires (Sporn, 1994). Les signaux rétinoïdes sont transmis par deux types de récepteurs rétinoïdes nucléaires, les RARs et les RXRs (Pfahl, 1994; Mangelsdor, 1995; Chambon, 1996). Les deux types de récepteurs sont codés par trois gènes différents dénommés  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ . Des évidences croissantes supportent l'hypothèse que le gène RAR $\beta$ 2 est un gène suppresseur tumoral et que les effets chimio préventifs des rétinoïdes sont liés à l'induction de RAR $\beta$ 2.

La perte de RAR $\beta$ 2 a été observée dans les tumeurs solides, comme le cancer de poumon et le cancer de sein (Picard, 1999; Xu, 1997; Xu, 1999). Ces résultats suggèrent que la perte de l'expression de RAR $\beta$ 2 peut être un événement important dans la tumorigenèse. Cette hypothèse est appuyée par l'observation que l'introduction du gène RAR $\beta$  dans une lignée de cancer du sein non sensible aux acides rétinoïques restaure la réponse à ces éléments avec une inhibition de la croissance et l'induction de l'apoptose (Sirchia, 2000 ; Widschwendter, 2000; Arapshian, 2000). Yang et al ont également démontré que l'inhibition transcriptionnelle de la région promotrice de RAR $\beta$ 2 était fortement liée à la méthylation de son promoteur, et que ce mécanisme est suffisant pour entraîner une inactivation bi allelique de RAR $\beta$ 2 qui ne peut pas être reversée par l'exposition aux agents déméthylants (Yang, 2002).

### **4.7.2. FHIT (Fragile Histidine Triad)**

Le bras court du chromosome 3 est un des sites le plus souvent atteint par des anomalies chromosomiques dans les tumeurs humaines. En 1996, une recherche intensive dans cette région a permis d'identifier le gène « fragile histidine triad » (FHIT) qui est une cible de réarrangement chromosomique située au niveau 3p14.2.

FHIT est un gène suppresseur de tumeur. Un pas important pour la caractérisation fonctionnelle de ce gène a été l'étude réalisée chez la souris; les animaux qui avaient une suppression de un ou des deux allèles de FHIT présentaient fréquemment des tumeurs comme des lymphomes ou des tumeurs hépatiques (Hao, 2000).

L'expression de FHIT est altérée dans plusieurs lignées cellulaires. Il est aussi inactivé dans une proportion significative de cancers et de conditions précancéreuses : de 20 à 100% selon le type tumoral. Cette statistique fait du FHIT le gène le plus fréquemment altéré dans les cancers humains (Pekarsky et al, 2002).

Le mécanisme moléculaire exact et la voie fonctionnelle de FHIT sont encore mal connus, mais nous savons que, au moins dans les cancers du poumon (Fong, 1997) et de l'œsophage, l'expression de FHIT peut être importante pour le diagnostic et le pronostic (Ohta, 1996). Des altérations dans l'expression de FHIT ont été détectées dans les lésions précancéreuses de l'œsophage, ce qui suggère que la perte d'expression de FHIT peut être un événement précoce dans le développement des cancers de l'œsophage (Michael, 1997).

L'hyperméthylation du gène FHIT a été décrite comme associée à l'inactivation de la transcription dans les carcinomes de l'œsophage (Tanaka, 1998). Dans une étude récente la méthylation anormale du promoteur FHIT a été associée à l'exposition au tabac et à un plus mauvais pronostic dans les cancers du poumon de stade 1 et 2, mais pas avec le risque de rechute. Les auteurs ont, donc, suggéré que la méthylation de FHIT pourrait être utilisée comme un marqueur biologique indépendant de pronostic (Lee, 2006).

### **4.7.3. BLU**

Le gène BLU est localisé sur le chromosome 3p. Il existe deux isoformes homologues à 94% qui contiennent le domaine MYND (un domaine conservé de liaison de l'ADN). Il a été démontré que le domaine MYND était présent dans certains répresseurs de la transcription ou de l'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire comme, par exemple, AML/ETO et BS69. Ces études suggèrent que les protéines qui présentent ce domaine peuvent contrôler l'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire (Liu, 2003).

Le rôle de BLU dans la tumorigenèse a commencé à être étudié avec l'analyse de la méthylation du promoteur de BLU dans les lignées cellulaires. En fait, il a été observé que la méthylation de BLU était corrélée à l'inhibition de son expression et que celle-ci était levée lorsque les cellules sont traitées avec du 5-aza 2-deoxycytidine, un agent déméthylant. Ces résultats suggèrent que l'inactivation épigénétique de BLU joue un rôle important dans la pathogenèse de cancers humains (Agathangelou, 2003). L'hyperméthylation du promoteur BLU est détectée dans les gliomes, les tumeurs du poumon, et dans les tumeurs neuroblastiques (Hesson, 2004; Qiu, 2004).

#### **4.7.4. INI1**

Récemment, la recherche du locus responsable d'une forme très agressive de tumeur pédiatrique, la tumeur rhabdoïde maligne, a permis l'identification des mutations bialleliques du gène INI1/hSNF5 sur le bras long du chromosome 22 (22q11.23) (Versteeg, 1998). INI1/hSNF5, qui est un composant du complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendante hSWI/SNF, peut être directement recruté vers le promoteur de la cycline D1 et bloquer son expression, entraînant une prolifération cellulaire anormale (Zhang, 2002). Cette mutation était, apparemment, dans les cas des tumeurs rhabdoïdes, la seule altération présente dans le génome de ces cellules. Ces résultats suggèrent aussi que la perte de la fonction d'INI1/hSNF5 ne résulte pas seulement dans une prolifération cellulaire non contrôlée associée à un blocage de la différenciation cellulaire, mais peut aussi être liée à d'autres phases de la progression tumorale, comme l'invasion, la capacité métastatique, et la résistance à la chimiothérapie pour lesquelles les mécanismes ne sont pas encore bien compris (Biegel, 1999).

Dans ces tumeurs, l'hyperméthylation de ce gène n'a pas pu être démontrée comme mécanisme d'inactivation (Zhang, 2002).

#### **4.7.5. NF2 (Neurofibromine 2)**

Le gène NF2 code pour une protéine de 595 acides aminés, connue sous le nom de merlin (acronyme du mot "Moesin-Ezrin-Radixin-Like Protein") (Trofatter, 1993). Bien que le gène NF2 ait été isolé il a une décennie, la fonction et les mécanismes d'action de merlin sont encore énigmatiques. Il a été démontré que merlin interagit soit directement soit indirectement avec de nombreuses protéines, suggérant plusieurs activités cellulaires. Différentes études ont montré que merlin joue un rôle dans la motilité et la prolifération cellulaire. De plus, la perte de fonction de merlin peut contribuer au signal anormal de la voie Ras/Rac, associée à la formation tumorale (Xiao, 2003). La perte de la fonction de merlin est liée à ces stades de la progression tumorale dans les modèles animaux. McClatchey et al., (1998) ont démontré que les fibroblastes embryonnaires primaires des souris (MEFs)  $Nf2^{+/-}$  sont très mobiles et que les tumeurs chez ces souris sont hautement métastatiques, ce qui est différent des tumeurs bénignes des patients porteurs de la neurofibromatose type 2. L'incidence de cette maladie chez les humains est rare (moins de 1/25.000 individus) et les symptômes associés sont également rares et limités (Evans, 2005). La principale caractéristique de cette maladie est le développement des tumeurs de cellules de Schwann (schwannomes) dans ou proche de la huitième paire de nerfs crâniens. Ce sont de tumeurs bénignes de croissance lente qui ne répondent pas bien à la chimiothérapie

(Evans, 1992). La plus grande partie des patients développent plusieurs schwannomes qui sont associés à d'autres nerfs crâniens, dans les racines nerveuses de la moelle, des méningiomes crâniens et spinaux et, moins fréquemment, des épendymomes.

La perte de merlin est fréquemment observée dans le mésothéliome humain malin, une tumeur hautement invasive, diffuse qui a comme origine les cellules mésotéliales des surfaces des cavités pleurales, péricardique et péritonéale (Bianchi, 1995, Xiao, 2003). Des études épigénétiques ont indiqué que l'hyperméthylation de NF2 peut participer dans le développement d'une partie des méningiomes sporadiques, principalement ceux de grade I (Lomas, 2005).

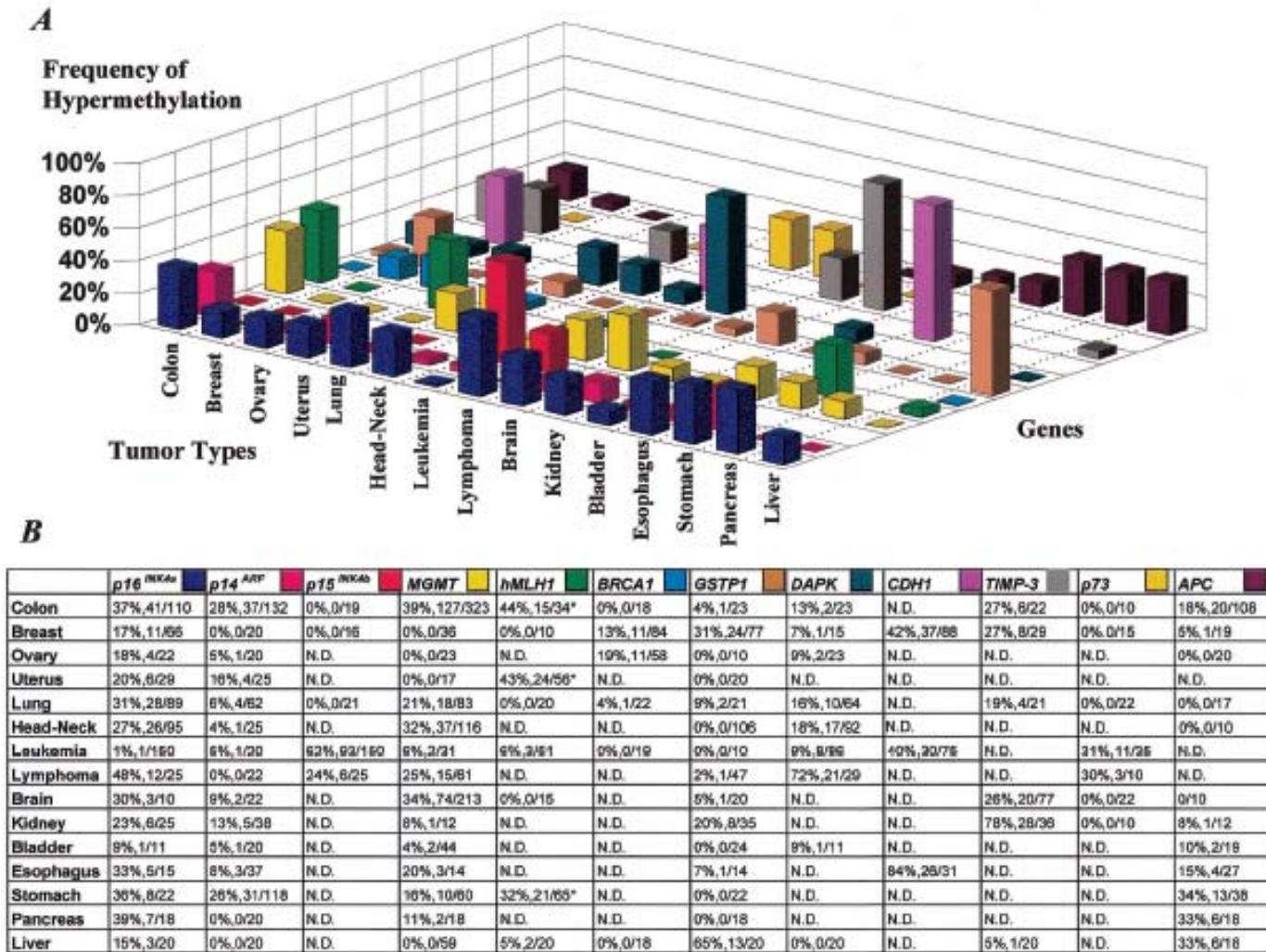
## 5.

# « METHYLOTYPE » OU PROFIL DE METHYLATION: MARQUEUR DIAGNOSTIQUE ET/OU PRONOSTIQUE

---

Le « Methylotype » ou profil de méthylation est une proposition actuelle d'une signature épigénétique d'une tumeur donnée. Il peut s'agir aussi bien d'un gène qui est méthylé spécifiquement dans un type de tumeur ou d'un groupe des gènes dont l'association des différentes méthylations caractérise la tumeur. Actuellement, il n'a pas pu être mis en évidence que la méthylation d'un seul gène puisse être utilisée comme marqueur d'une tumeur, mais l'association de plusieurs gènes pourrait permettre la distinction entre une tumeur bénigne et maligne ou entre une lésion pré néoplasique et le tissu normal. Les nombreuses études sur la méthylation des tumeurs solides ont suggéré l'existence d'un profil de méthylation des îlots CpG caractéristique de chaque type de néoplasie (Figure 14).

Figure 14. A, description du profil d'hyperméthylation des gènes promoteurs dans les tumeurs humaines. B, distribution numérique des hyperméthylations des promoteurs selon les tumeurs et les gènes.



D'après Esteller et al, 1991.

Seuls les marqueurs de méthylation qui sont toujours non méthylés dans les cellules normales peuvent être inclus dans ce groupe de gènes étudiés. Nous pouvons citer le cas de tumeurs de la prostate où un seul marqueur, GSTP1, est informatif dans 80-90% des cas (Lee, 1994). Nous décrivons dans nos résultats l'exemple des neuroblastomes de l'enfant qui présentent la méthylation de RASSF1A dans 93% des tumeurs primitives et dans 100% des rechutes. L'association de plusieurs marqueurs pourrait donc permettre d'obtenir une sensibilité proche de 100%, parce que les cas où un seul gène permet la différenciation d'une tumeur donnée par rapport aux tissus normaux ou des lésions pré-néoplasiques sont encore rares.

Beaucoup de variations sont décrites entre les profils de méthylation d'un même type histologique à cause, probablement, de deux problèmes. Le premier est que le panel de gènes

étudiés dans un type de tumeur n'est pas encore bien défini. Le deuxième est que des méthodes différentes peuvent être utilisées avec des sensibilités et des spécificités différentes, n'évaluant pas forcément la même région d'un gène, et pouvant exprimer les résultats de manières différentes.

Si nous voulons utiliser ces marqueurs épigénétiques en clinique, nous devons utiliser des moyens rapides, faciles et sensibles de détection. Dans cet esprit, l'hyperméthylation des îlots CpG pourrait être utilisée comme un outil pour détecter les cellules cancéreuses dans tous les types de liquides biologiques (lavages broncho-alvéolaires, ganglions, crachat, urine, sperme, et salive) et dans des petits prélèvements comme les biopsies (Esteller, 2002 ; Laird, 2003). Cette détection est également possible au niveau de l'ADN circulant chez les patients porteurs d'une tumeur (Esteller, 1999).

Un autre facteur d'intérêt est le fait que l'hyperméthylation des îlots CpG des gènes suppresseurs de tumeur apparaît précocement au cours de la tumorigenèse. Plusieurs exemples peuvent être cités, comme la présence de l'hyperméthylation du gène APC dans les adénomes colorectaux et l'hyperméthylation de hMLH1 dans les aplasies atypiques l'endomètre (Esteller, 2002). Ainsi, la présence de méthylations anormales n'est pas forcément un signal de la présence d'un cancer invasif. Ces résultats pourraient être utiles dans la surveillance des personnes à haut risque afin de pouvoir effectuer un diagnostic précoce.

Les études actuelles recherchent une association entre l'hyperméthylation des gènes suppresseurs et l'évolution tumorale dans l'idée de prévoir l'évolution et la réponse au traitement. En effet, il a été mis en évidence que chez les patients porteurs d'un gliome traité par un agent alkylant, l'inhibition de l'expression du gène MGMT associée à la méthylation de son promoteur était associée à la réponse à la chimiothérapie, survie globale, et à une progression plus lente de la tumeur (Esteller, 2000a ; Balana, 2003). En fait, l'hyperméthylation de MGMT *per se* sans le traitement par un alkylant n'est pas un facteur pronostique. C'est une des possibilités d'exploitation de l'épigénétique : la pharmacogénomique.

## 6.

# AGENTS DEMETHYLANTS

---

Les cibles de ces agents sont les méthyltransférases. Actuellement, plusieurs études ont montré que les cellules traitées par un médicament anti-méthylant peuvent réactiver les gènes initialement inactifs (Cameron, 1999). Le problème reste le transfert vers les expériences *in vivo* à cause de l'absence de spécificité des drogues utilisées.

Plusieurs variants moléculaires de déoxycytidine ont été développés, modifiés surtout au niveau de l'anneau pyrimidine. Quatre agents sont actuellement testés en clinique: 5-azacytidine (azacitidine); 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine), 1- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-5-azacytosine (fazarabine) et dihydro-5-azacytidine (DHAC).

Ces drogues ont une action dans la prévention de la méthylation, mais elles agissent aussi par d'autres mécanismes. Après phosphorylation, elles sont incorporées au niveau de l'ADN ou de l'ARN (Lubbert, 2000). La decitabine, par exemple, est incorporée principalement dans l'ADN, alors que l'azacitidine est incorporée préférentiellement dans l'ARN (Santini, 2001). Une fois incorporées ces drogues forment une liaison covalente avec les DNMT pouvant induire la mort cellulaire par inhibition de la synthèse d'ADN (Juttermann, 1994). De plus, les DNMTs ne sont plus actives et une déméthylation significative est observée après plusieurs réplifications (Santini, 2001). L'incorporation de ces agents dans l'ARN, entraîne également une dégradation ribosomale, des défauts dans la fonction des ARNt et une inhibition de la synthèse protéique (Santini, 2001).

Ainsi, ces agents inhibent les DNA méthyltransférases (DNMTs) et produisent une hypométhylation globale qui semble universelle, affectant toutes les cellules humaines (Villar-Garea, 2003). Le potentiel d'interférence avec l'activité des cellules normales est une inquiétude permanente, mais il existe quelques arguments théoriques laissant penser que la déméthylation aura un effet moins important dans les cellules normales que dans les cellules tumorales. Premièrement, la méthylation des dinucléotides CpG des régions promotrices proximales est rare dans les cellules normales, l'expression normale des gènes ne devrait donc pas être affectée par la déméthylation. Deuxièmement, la déméthylation des gènes impliqués dans l'empreinte génomique parentale est plus importante pendant l'embryogenèse qu'après (Barlow, 1995). Enfin, la réactivation du chromosome X chez les femmes pourrait être une inquiétude après

l'embryogenèse, mais des études des lignées cellulaires ont évalué ce risque. Des fibroblastes des femmes mélangées avec des cellules néoplasiques traités avec la decitabine montrent que les cellules normales ne sont pas affectées par le traitement mais que les cellules néoplasiques prolongent leur temps de doublement (Bender, 1998).

Cependant la déméthylation peut être dangereuse dans certaines situations. Ainsi, dans les lignées cellulaires issues des leucémies, l'hypométhylation du gène de résistance aux drogues MDR1 est liée à une chimiorésistance et dans ce cas, la decitabine augmente l'expression du produit de MDR1 (Kantharidis, 1997).

Actuellement quelques résultats encourageants sont disponibles avec ces agents et les leucémies de l'enfant et des adultes. La decitabine a montré une efficacité, sans association avec d'autres agents, dans les leucémies aiguës et est bien tolérée dans les associations thérapeutiques. Les résultats des études réalisées sur des tumeurs solides sont moins convaincants, avec une absence des réponses objectives et une rare stabilisation de la maladie (revue par Goffin, 2002).





# **CHAPITRE 2.**

## **LES CANCERS DE L'ENFANT**

---

### **1.**

### **GENERALITES**

---

Les cancers de l'enfant sont des maladies rares (0,5 à 1% de l'ensemble des cancers), certaines sont mal connues et insuffisamment étudiées sur le plan biologique. C'est avec l'avancement de la thérapeutique et la diminution de la mortalité que des marqueurs diagnostiques aussi bien que des facteurs biologiques pronostiques ont commencé à être décrits. L'objectif de ce chapitre est de faire le point sur l'incidence, les taux de mortalité des cancers de l'enfance et l'évolution de ces taux dans le temps aussi bien que rapporter l'état des connaissances sur la méthylation dans les cancers de l'enfant. Une description épidémiologique et clinique plus détaillée sera faite dans un chapitre spécifique pour les deux groupes de tumeurs auxquelles nous nous sommes intéressés: les épendymomes cérébraux et les neuroblastomes.

#### **1.1. EPIDEMIOLOGIE ET PARTICULARITES BIOLOGIQUES**

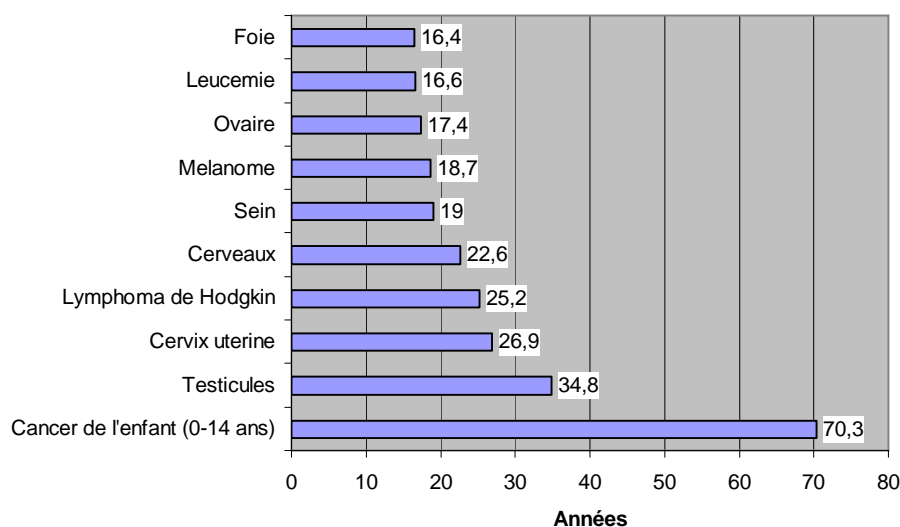
Aux États-Unis, chaque année environ 1/7000 enfants de 7 à 14 ans développe un cancer. Ainsi, en 1998, un diagnostic de cancer avait été établi chez 12400 enfants et adolescents de moins de 20 ans (8700 cas pour les enfants de 0 à 14 ans et 3700 cas pour ceux de 15 à 19 ans).

De plus, les cancers de l'enfant sont toujours la première cause de mortalité liée à une maladie après l'âge d'un an et la deuxième après les accidents, et aboutissent donc à une diminution de l'espérance de vie (Figure 15).

En Europe, « The Automated Childhood Cancer Information System » (ACCIS) est un projet qui a comme objectifs la collecte, la présentation et l'interprétation des données sur l'incidence et la survie des enfants et des adolescents qui ont un cancer. Cette base de données contient les données de 80 registres des cancer qui couvrent la moitié de la population entre 0 et 14 ans et un quart de celles entre 15 et 19 ans qui vivent dans les 35 pays participants. Il contient un total de 160 000 cas de cancers de l'enfant et de l'adolescent diagnostiqués depuis 1970.

En France, le registre national français des leucémies et lymphomes de l'enfant (RNHE) a été créé en 1995 par l'unité INSERM 170 avec la collaboration des réseaux français thérapeutiques d'hémo-oncologie pédiatrique. Le Registre National des Tumeurs Solides de l'Enfant (RNTSE) a été qualifié en 1999 pour assurer la surveillance de la totalité des cancers de l'enfant sur le territoire français en complément du RNHE; sa mise en place a été effective en 2000. Pour les deux premières années d'enregistrement 2000 et 2001, le RNTSE a inclus 1 813 cas de tumeurs solides, soit une moyenne de 907 cas par an. La distribution par type de cancer et l'incidence sont comparées aux résultats des registres pédiatriques régionaux français portant sur la période 1990 à 1999 qui constituaient la référence.

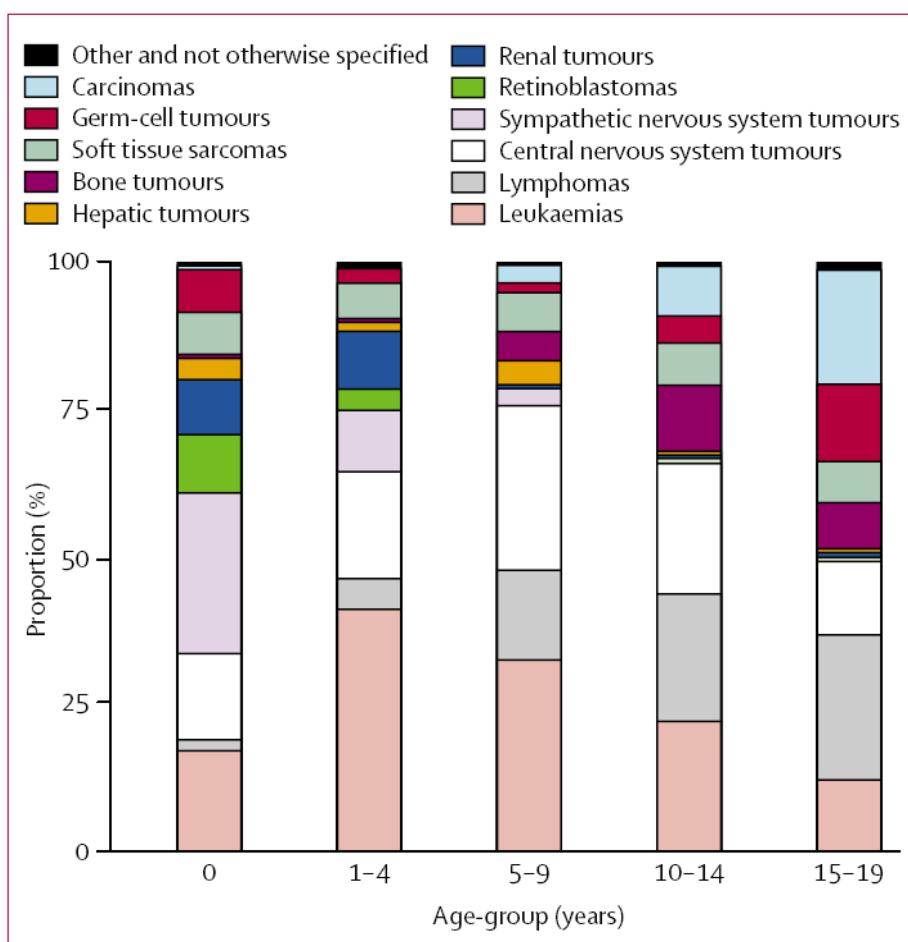
**Figure 15. Moyenne des années de vie perdues par personne qui décède d'un cancer, tous sexes et races confondus, 2002**



*D'après le programme « Surveillance, Epidemiology, and End Results » (SEER) du « National Cancer Institute » (NCI).*

Les tumeurs de l'enfant ne se présentent pas comme celles de l'adulte : les localisations ne sont pas les mêmes, les types histologiques sont extrêmement variés, et chaque tumeur a son âge d'apparition (Figure 16). La tumeur la plus fréquente chez le nouveau-né est le neuroblastome (28%). Les leucémies sont les plus fréquentes chez les enfants entre 1 et 4 ans (41%) et les tumeurs du système nerveux central entre 5 et 9 ans (28%). Les autres types de tumeurs sont plus rares, chacune d'entre elles représentant environ 10% de l'ensemble des cancers chez l'enfant. Après l'âge de 10 ans les tumeurs embryonnaires, tels que les rétinoblastomes, les néphroblastomes et les hépatoblastomes, sont presque inexistantes alors que d'autres tumeurs apparaissent telles que les lymphomes, les tumeurs osseuses et les carcinomes. Chez l'adolescent les lymphomes représentent 25% et les carcinomes 20% du total (Steliarova-Foucher, 2004).

**Figure 16. Répartition des 12 principales tumeurs de l'enfance en Europe par groupe d'âge**



*D'après Steliarova-Foucher, 2004.*

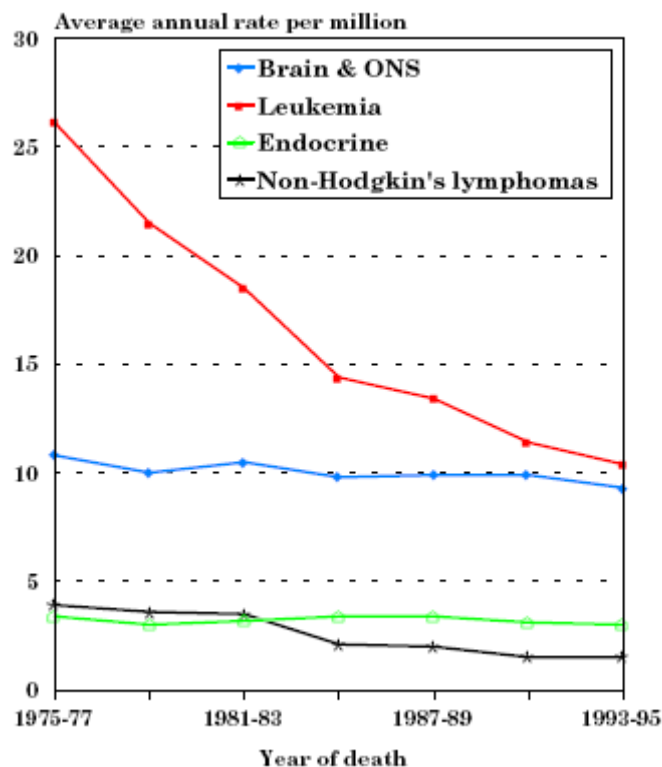
De plus, dans l'étude publiée en 2004 par Steliarova- Foucher, il a été observé que l'incidence globale des cancers de l'enfant augmente avec le temps. La moyenne en nombre de cas par million était de 118 pendant les années 70, de 124 pendant les années 80 et de 139 pendant les années 90s (Steliarova-Foucher, 2004).

Les cancers de l'enfant sont particuliers du point de vue histologique et évolutif; ils prolifèrent très vite et régressent aussi très vite en réponse à la chimiothérapie et la radiothérapie auxquelles ils sont majoritairement particulièrement sensibles. Cette réponse aux traitements explique l'augmentation du nombre de guérisons. Aux Etats-Unis et en Europe la survie à 5 ans était de 28 % en 1960, alors qu'aujourd'hui les taux oscillent autour de 80 % à 3 ans et de 75 % à 5 ans. (Figure 17). L'évolution des traitements radiothérapiques et la découverte des nouveaux médicaments a été un facteur supplémentaire dans l'amélioration des pronostics.

Par contre, l'étiologie de la plupart des cancers de l'enfant reste encore mal connue. Parmi les facteurs de risque, les expositions professionnelles des parents ont fait l'objet de nombreuses études. Les solvants organiques et les pesticides sont les facteurs le plus fréquemment mis en cause, en particulier dans les tumeurs cérébrales et les hémopathies malignes (McNally, 2006). Les facteurs infectieux sont l'une des pistes les plus sérieuses, notamment pour les hémopathies malignes qui sont dues, dans de nombreuses espèces animales à des virus du groupe herpes ou à des rétrovirus (Nienhuis, 2006). L'augmentation du niveau d'hygiène, induisant un retard de maturation du système immunitaire, est également mise en cause dans les leucémies de l'enfant. De plus, les données disponibles ne permettent pas d'éliminer un rôle des consommations de tabac et d'alcool de la mère pendant la grossesse ou de son alimentation.

Dans cette thèse j'ai étudié deux groupes de tumeurs de l'enfance qui sont fréquentes, mais biologiquement très différentes et qui seront donc analysées dans deux chapitres distincts. Les épendymomes, un type de tumeur cérébrale, où aucun marqueur biologique permettant d'évaluer la probabilité de rechute ou d'une éventuelle réponse au traitement n'a été décrit à ce jour; et les neuroblastomes, déjà étudiés en Hybridation Génomique Comparative (CGH) au laboratoire (Plantaz, 2001), pour lesquels nous disposons de plusieurs échantillons à des stades différents et qui sont connus par le grand nombre d'altérations génétiques et leur importance pronostique en particulier celle de l'amplification de l'oncogène NMYC.

Figure 17. Exemples d'évolution des taux de mortalité par cancer chez les enfants entre 5-9 ans des deux sexes aux USA.

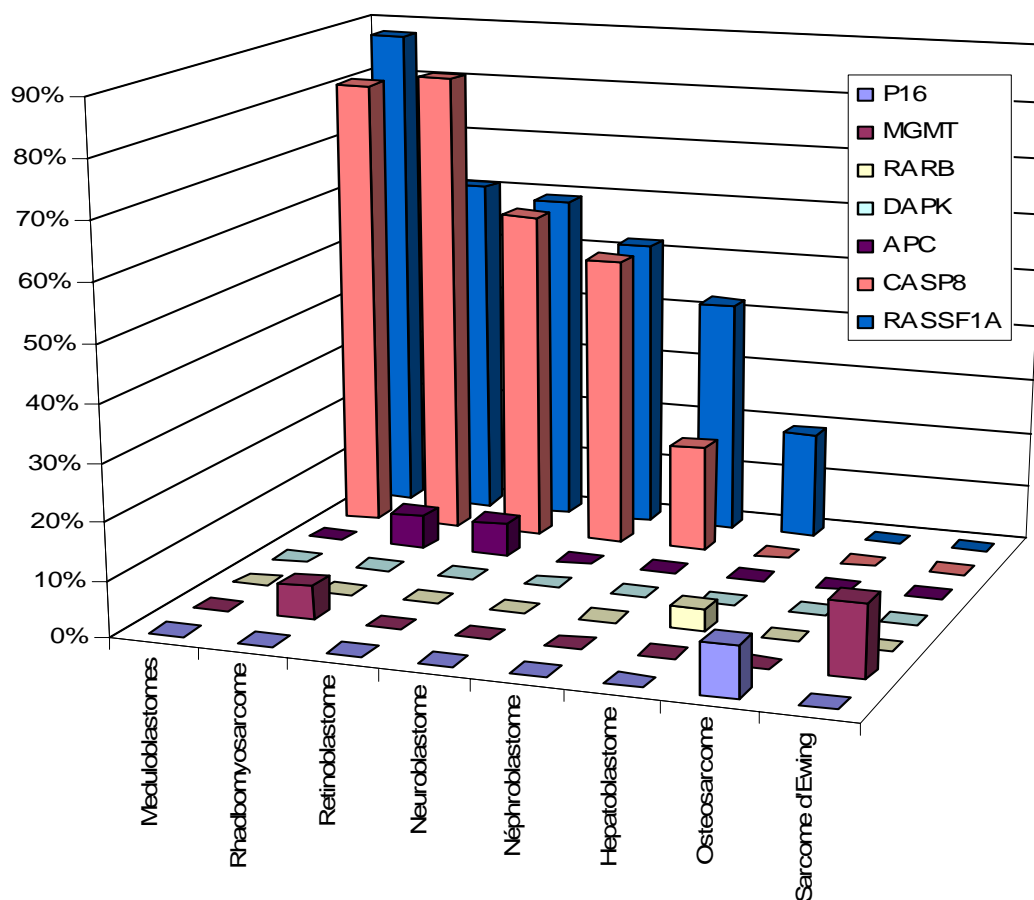


D'après « Surveillance, Epidemiology, and End Results » (SEER) du « National Cancer Institute » (NCI)

## 1.2. METHYLATION ET TUMEURS SOLIDES DE L'ENFANT

Les études décrivant des profils de méthylation ont surtout été réalisées dans les cancers de l'adulte. Des études de méthylation de grandes cohortes sont beaucoup plus rares chez les enfants, mais petit à petit des groupes de recherche commencent à s'intéresser à ces tumeurs malgré leur rareté. Dans un premier temps, plusieurs gènes ont été étudiés dans des séries des tumeurs pédiatriques et des lignées cellulaires avec pour objectif de caractériser les gènes d'intérêt dans ces pathologies (Harada, 2002 a et b) (Figure 18). Ces études ont permis d'observer que les gènes le plus souvent méthylés dans les cancers des enfants ne sont pas les mêmes que dans les tumeurs de l'adulte, mais plutôt des gènes liés à l'apoptose comme CASP8. Récemment, des résultats intéressants ont été publiés dans les rétinoblastomes, néphroblastomes et ostéosarcomes dont nous faisons état dans ce chapitre. Nous verrons plus en détails les tumeurs du système nerveux central et les neuroblastomes dans des chapitres spécifiques.

Figure 18. Méthylation des gènes suppresseurs dans certains groupes de tumeur de l'enfance



Adapté d'Harada, 2002a et 2002b.

### 1.2.1. Les Rétinoblastomes

Le rétinoblastome, une tumeur maligne de la rétine de l'enfant, ayant pour origine l'inactivation du gène Rb1. Cette inactivation se fait, le plus fréquemment, par des mutations qui affectent la région codante. En plus des ces anomalies génétiques, quelques études ont décrit l'inactivation de Rb1 par méthylation de sa région promotrice (Ohtani-Fujita, 1993).

Joseph et al. (2004) ont détecté une méthylation de Rb1 dans 6,6% de ces échantillons. Ces résultats sont similaires à ceux décrits par Sakai et al. (7%) et un peu inférieurs à ceux de Zeschnigk, 1999 (10%). Ces méthylations ne sont observées que dans les cas des rétinoblastomes unilatéraux et sporadiques; les auteurs font donc l'hypothèse que la méthylation de Rb1 joue un rôle principalement dans la tumorigenèse des ces rétinoblastomes (Sakai, 1991 ; Ohtani-Fujita, 1993 ; Zeschnigk, 1999 ; Joseph, 2004).

L'autre gène pour lequel la méthylation a été évaluée dans le rétinoblastome est le gène MGMT. A notre connaissance, la seule étude est celle de Choy et collaborateurs qui a démontré que l'expression de MGMT était souvent absente dans les rétinoblastomes à cause de la méthylation de sa région promotrice (Choy, 2002).

### **1.2.2. Les Néphroblastomes (Tumeur de Wilms)**

A ce jour, le profil de méthylation des néphroblastomes a surtout été étudié dans le syndrome de Beckwith-Wiedeman (BWS). Ce syndrome se caractérise par une surcroissance congénitale associée ou non à d'autres anomalies. Les enfants sont souvent diagnostiqués à la naissance par une surcharge pondérale associée à une macroglossie et à des défauts de la paroi abdominale. Des organomégalies et des asymétries des membres (hemihypertrophie) peuvent également être observées (Elliot, 1994). De plus, ces enfants développent fréquemment des tumeurs, en particuliers des néphroblastomes ou tumeur de Wilms. Ces enfants sont, donc, soumis à des examens réguliers pour détecter précocement ces cancers. Selon certains protocoles, une échographie abdominale est réalisée tous les 3 mois en même temps que les dosages de l' $\alpha$ -foetoprotéine. Ce suivi régulier strict augmente le nombre de néphroblastomes détectés à ces stades précoces (I et II), améliorant ainsi le pronostic de ces enfants (Beckwith, 1998; McNeil, 2001), d'autant qu'ils sont particulièrement exposés à une tumeur contrelatérale métachrone.

Les gènes associés au BWS sont localisés au niveau du locus 11p15 et sont soumis à l'empreinte génomique parentale. En effet, dans cette région il existe deux domaines d'empreinte, chacun régulé par son propre centre d'empreinte, BWSIC1 et BWSIC2. Pour l'utilisation diagnostique, les profils de méthylation sont établis pour les gènes H19 pour BWSIC1 et KCNQ1OT1 pour BWSIC2 (Bliet, 2001).

Ces enfants peuvent être divisés en 4 groupes différents selon leur profil de méthylation :

1. Groupe I (20-25%) : défaut de méthylation des deux régions à cause d'une disomie uniparentale ;
2. Groupe II (10%) : méthylation de BWSIC1, qui entraîne l'hyperméthylation de l'allèle H19 maternel ;
3. Groupe III (40-50%) : défaut de méthylation de BWSIC2 qui se traduit par l'hypométhylation de l'allèle maternel de KCNQ1OT1 ;



4. Groupe IV (30%) : profil de méthylation normal des deux régions. (Blied, 2001 ; Gaston, 2001).

Une publication récente de Blied fait la synthèse de trois études portant sur la méthylation de BWSIC1 et BWSIC2 pour 287 patients (Tableau I) (Blied, 2004). Il a été observé à partir de l'étude de l'ADN lymphocytaire que les défauts de la méthylation de BWSIC2 (groupe III) étaient associés à un faible risque de tumeur (6%), alors que 52% des patients présentant une méthylation de BWSIC1 développaient une tumeur. De plus, les tumeurs étudiées dans ce groupe sont principalement des néphroblastomes (Blied, 2004).

**Tableau I. Association entre le risque de développer une tumeur et défaut de méthylation dans les BWS.**

	<b>Groupe I</b>	<b>Groupe II</b>	<b>Groupe III</b>	<b>Groupe IV</b>
<b>Profil de Méthylation</b>	KCNQIOTI Hypométhylé H19 méthylé	H19 méthylé	KCNQIOTI hypométhylé	Pas d'altération
<b>Pourcentage de tumeur (%)</b>	36	52	6	22
<b>Néphroblastome/ Total</b>	10/18	11/11	0/7	9/13

*D'après Blied, 2004.*

Il semblerait donc, que dans les cas des BWS, il soit possible de différencier les patients porteurs d'un haut ou d'un bas risque de tumeurs basé sur le profil de méthylation de l'ADN. Ces différences pourraient être utilisées pour élaborer des protocoles de suivi adaptés à chaque patient.

### 1.2.3. Les Ostéosarcomes

L'ostéosarcome est la tumeur osseuse maligne primitive la plus fréquente chez l'enfant. Il y a quelques années, mortalité liée à la maladie était de 80%. Actuellement, avec l'évolution des outils diagnostiques et l'amélioration du traitement, le taux de survie est approximativement de 70% (Maitra, 2001). Malgré cela, le mécanisme d'oncogenèse de l'ostéosarcome n'est pas clairement défini. Il semble que les dérégulations des voies Rb et p53 du cycle cellulaire pourraient contribuer à la croissance tumorale et à l'oncogenèse des ostéosarcomes.

En 2006, deux articles portant sur la méthylation des gènes suppresseurs de tumeur dans les ostéosarcomes ont été publiés. Dans le premier, Oh et al. détectent la méthylation de p16<sup>INK4A</sup> dans 5 (16%) et celle de p14<sup>ARF</sup> dans 15 (47%) des 32 tumeurs étudiées. Un seul ostéosarcome présentait une méthylation des deux gènes. Les auteurs suggèrent que malgré leur localisation

commune ces deux gènes présentent des méthylations indépendantes. La médiane de survie était de 52 mois dans le groupe des patients porteurs de la méthylation de p14<sup>ARF</sup> et de 69 mois dans le groupe qui ne présentait pas cette anomalie. Une relation entre la survie et la méthylation de ce gène est donc proposée ( $p=0.03$ ).

Dans la deuxième étude, une analyse quantitative par MethyLight de la méthylation de 5 gènes (RASSF1A, MGMT, TIMP3, DAPK1, p16) dans 30 ostéosarcomes a été réalisée. Les résultats indiquent que le taux de méthylation des 4 gènes (RASSF1A, TIMP3, MGMT et DAPK1) est plus important dans les tissus tumoraux que dans les tissus normaux. P16 (CDKN2A) ne présentait pas de différence significative entre les deux groupes.

L'étude des 5 gènes permet d'identifier des anomalies dans 93% des tumeurs alors que l'analyse individuelle de chaque gène a donné des résultats positifs dans 15-83% des échantillons selon le gène analysé. Les auteurs suggèrent, donc, que la méthylation de plusieurs gènes pourrait être utilisée comme un biomarqueur de diagnostic et de suivi dans les ostéosarcomes (Hou, 2006).

## 2.

# LES EPENDYMOMES

---

### 2.1. ASPECTS HISTOLOGIQUES ET CLINIQUES

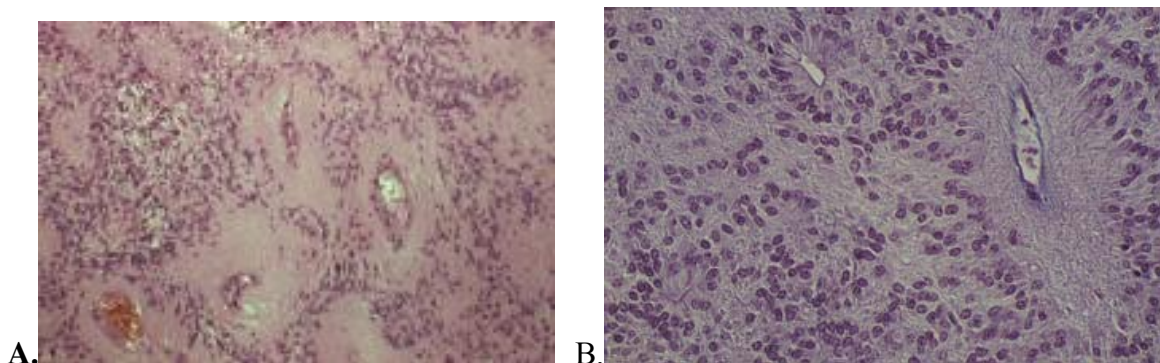
La classification des tumeurs du système nerveux central (SNC) a été très difficile pendant plus de 100 ans. Dès le départ, plusieurs classifications histologiques ont coexisté, reflétant l'absence de consensus entre les pathologistes. La classification des tumeurs du SNC est devenue cliniquement importante avec l'amélioration des techniques neurochirurgicales.

La classification actuelle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Kleihues, 2000) utilise le terme épendymome pour décrire des tumeurs qui présentent en microscopie, soit la rosette épendymale (composée des éléments épendymaux alignés d'une façon radiale autour d'un lumen central) (Figure 19 B) soit plus fréquemment la pseudo rosette (un halo éosinophile composé de cellules autour d'un vaisseau sanguin) (Figure 19 A). Ces tumeurs peuvent varier histologiquement : de tumeurs bien différenciées, sans anaplasie et peu polymorphes à des tumeurs riches en cellules avec une activité mitotique, une anaplasie et une nécrose importantes. Selon les données récentes de la « Surveillance, Epidemiology, and End Results » (SEER) les épendymomes constituent approximativement 9% de toutes les tumeurs primitives du SNC des enfants avec l'incidence la plus élevée pendant les 7 premières années de la vie (Gurney, 1999). Ces tumeurs ont pour origine les cellules épendymales du système ventriculaire ou du canal central de la moelle épinière. Quatre-vingt-dix pour cent de ces tumeurs sont intracrâniennes, et presque deux tiers de ces dernières se situent dans la fosse postérieure. Elles sont normalement bien délimitées avec des zones de calcification, des zones hémorragiques ou kystiques. Malgré cela, les épendymomes sont des tumeurs localement invasives qui s'infiltrent par contiguïté dans le tissu cérébral adjacent (Figure 20). Les tumeurs de la fosse postérieure infiltrent fréquemment le tronc. Dans 1/3 des cas, la tumeur peut se projeter à travers le foramen ovale et infiltrer la moelle épinière. L'incidence de dissémination spinale sous arachnoïdienne est estimée entre 7%

et 12%. Les métastases systémiques sont rares et, quand elles sont présentes, montrent une prédilection pour le foie, les poumons et l'os.

**Figure 19. Épendymome.**

**A. Histologie d'un épendymome classique avec les pseudo rosettes péri vasculaires. B. Grande rosette péri vasculaire (constituée par la convergence de longs prolongements cellulaires vers la paroi vasculaire) et la cavité épendymaire (bordée par une rangée de cellules épithéliales).**

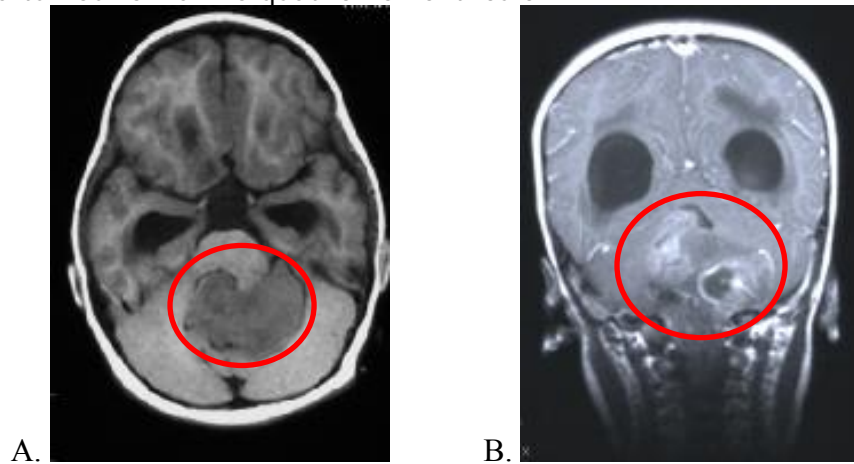


D'après <http://anocef.unice.fr/atlasneuro/>

Le facteur pronostique le plus important est la qualité de la résection tumorale. Les patients pour lesquelles la tumeur a été complètement réséquée et ceux qui ont moins de 1.5 cm<sup>2</sup> de maladie résiduelle à l'IRM ont un meilleur taux de survie que ceux pour lesquels la tumeur est partiellement réséquée. Les taux de survie varient de 66% à 75% après une résection complète alors qu'ils ne sont que de 0% à 11% lorsque la résection est partielle. Les jeunes enfants (de moins de 4 ans) ont plus souvent des tumeurs de la fosse postérieure et, dans cette localisation, les tumeurs sont plus invasives et la résection complète est souvent plus difficile. Le jeune âge a donc été décrit comme un facteur péjoratif pour la survie. Jusqu'à ce jour aucun marqueur biologique n'a pu être utilisé comme marqueur diagnostique de la maladie ou corrélé à l'évolution clinique (Strother, 2002).

**Figure 20. Imagerie dans l'Épendymome.**

A. IRM T1 sans contraste démontrant l'épendymome dans le quatrième ventricule. B. IRM T1 coronale, la tumeur envahi le quatrième ventricule.



Le traitement est donc surtout basé sur la chirurgie pour la résection des épendymomes de la fosse postérieure avec des techniques semblables à celles utilisées pour la résection des médulloblastomes. La radiothérapie semble améliorer légèrement les taux de survie de ces enfants, mais présente des effets indésirables tardifs, surtout du point de vue cognitif. Son utilisation est donc proscrite chez les enfants de moins de 5 ans (Grill, 2003 ; Merchant, 2004). Malgré l'utilisation de plusieurs types de chimiothérapie, aucun protocole n'a montré une amélioration de la survie chez les patients présentant une tumeur totalement ou partiellement réséquée (Strother, 2002).

## 2.2. ASPECTS CYTOGENETIQUES

Récemment, plusieurs groupes ont étudié les anomalies génétiques dans ces tumeurs dans l'intention de trouver un marqueur spécifique. Des troubles génomiques multiples ont été décrits, incluant des pertes chromosomiques partielles ou totales (1p, 4q, 6q, 9, 10, 11, 13, 16, 17, 19q, 20q et 22q), mais 40% des épendymomes de l'enfant ne présentait aucune anomalie chromosomique décelable (Reardon, 1999, Ward, 2001). Les anomalies les plus fréquemment décrites sont la perte du bras long des chromosomes 22 et 6 qui sont présentes dans respectivement 23% et 15% de ces tumeurs (Blaeker, 1996 ; Zheng, 2000 ; Grill, 2002), suggérant la présence de gènes suppresseurs de tumeur au niveau de ces chromosomes; et le gain de 1q présent dans 20 % des cas (Ward, 2001). Ces études ont pu aussi démontré que les

altérations génétiques sont différentes chez l'enfant et chez l'adulte et aussi selon la localisation tumorale (intracrânienne ou spinale) (Jeuken, 2002).

### **2.2.1. Le chromosome 22**

Les épendymomes sont plus fréquents chez les patients porteurs de neurofibromatose de type 2 (NF2), une maladie héréditaire caractérisée par le développement de schwannomes vestibulaires bilatéraux et de méningiomes (Martuza, 1988 ; Rubio, 1994). Le gène NF2, qui se localise sur le chromosome 22, est muté dans un pourcentage élevé des méningiomes et schwammomes de l'adulte et cette mutation a déjà été décrite dans le cadre des épendymomes de localisation spinale (Tong, 1999). NF2 pourrait donc être un gène important dans la genèse des épendymomes de l'enfance. Ebert et al, 1999 (Ebert, 1999) ont observé une délétion fréquente du chromosome 22 dans les épendymomes spinaux corrélée à une mutation du gène NF2. Dans le cadre des épendymomes intracrâniens, la délétion de 22q n'est pas liée à une mutation de NF2. Cet auteur a suggéré, donc, qu'un autre gène suppresseur de tumeur dans la région 22q (INI1/hSNF5/SMARCB1) pouvait être responsable de la carcinogenèse dans ces tumeurs. Cette observation a été confirmée par d'autres études (Carter, 2002).

Les résultats pour INI1 ont été très attendus dans les épendymomes, ce gène étant localisé sur chromosome 22q, et muté dans les tumeurs rhabdoïdes pédiatriques (Versteeg, 1998). Kraus et al, 2001 ont réalisé une analyse moléculaire de 53 épendymomes et n'ont pas pu identifier des mutations ou délétions homozygotes du gène INI1. Ils ont, donc, conclu que INI1 n'a pas de rôle dans la pathogenèse des épendymomes, mais ont démontré encore une fois une haute fréquence de perte allélique du chromosome 22, avec les taux le plus haut dans les localisations spinales (Kraus, 2001).

### **2.2.2. Le chromosome 6**

Huang a montré que la LOH la plus fréquente avait lieu dans la région 6q (30.3 % des tumeurs testées présentaient une délétion d'une partie ou de tout le bras long du chromosome 6) (Huang, 2003). Auparavant Reardon avait montré que des délétions et des réarrangements de la région 6q dans des proportions variables étaient parfois plus fréquents que ceux observés sur le chromosome 22 (Reardon, 1999). Ces délétions et ces réarrangements de la région 6q ont été déjà décrits dans d'autres types de tumeurs comme les gliomes (Liang, 1994), les tumeurs primitives neuroectodermiques (PNET) (Thomas, 1991) et les leucémies aiguës (Hayashi, 1990). De plus, des délétions ponctuelles des loci 6q22 et 6q23-q24 ont été corrélées à la progression

maligne de tumeurs pancréatiques endocriniennes (Barghorn, 2001). Dans l'étude de Huang (2003) le locus le plus souvent délété est 6q24-25.3, mais des anomalies sont aussi détectées au niveau de 6q15-16 et 6q21-22.1. Cette région présente plusieurs gènes qui ont été clonés comme par exemple IGF2R, MAP3K5, et ZAC. Ce dernier, inhibe la prolifération des cellules tumorales in vitro et in vivo chez la souris (Spengler, 1997) et son expression est perdue ou réduite dans les lignées cellulaires des cancers du sein et dans les tumeurs primitives du sein (Bhattacharjee, 1997). Par rapport à la région 6q15-16, plusieurs études ont décrit la délétion de cette région dans les cancers du sein, leucémies aiguës et lymphomes non Hodgkiniens (Merup, 1998). Un facteur de transcription, BACH2, qui possède un rôle dans la prolifération cellulaire a été localisé dans cette région (Sasaki, 2000). Indépendamment du gène cible des délétions dans cette localisation, il semble définir un événement important dans la pathogenèse des épendymomes. D'autres études sont en cours pour identifier des possibles GST dans ces régions et déterminer leur rôle dans la tumorigenèse des épendymomes.

### **2.2.3. Autres altérations chromosomiques**

D'autres études, moins nombreuses ont montré aussi des anomalies au niveau des chromosomes 17 et 1q (von Haken, 1996 ; Dyer, 2002). Le gène suppresseur de tumeur TP53, localisé au locus 17p13, a été considéré comme un gène candidat dans la genèse des épendymomes. Quelques rares études ont évalué la mutation de ce gène dans les épendymomes et ont montré sa faible fréquence (von Haken, 1996).

La région où les gains sont les plus fréquents est la région 1q qui est présent dans 20% des tumeurs de certaines séries (Ward, 2001). D'autres études ont aussi démontré la présence des copies supplémentaires de 1q et dans deux cas elle était la seule anomalie décrite (Neumann, 1993 ; Mazewski, 1999). De nombreuses translocations avec cassures entre 1q11 et 1q25 ont été observées, et plusieurs entraînent une trisomie partielle de 1q (Neumann, 1993 ; Mazewski, 1999). D'autres études sont actuellement nécessaires pour évaluer la présence de gènes candidats dans cette région.

Malgré cela, il n'a jamais pu être mis en évidence une association entre une de ces anomalies génétiques et la survie. De plus, une grande partie des études évalue les épendymomes de l'enfant et des adultes ensemble, malgré les nettes différences de présentation clinique (les enfants ont des localisations intracrâniennes plus fréquentes et les adultes, surtout rachidiennes), de survie et de profil génétique (plus d'altérations cytogénétiques décrites dans les tumeurs des adultes) (Jeuken, 2002).

### **2.3. ASPECTS EPIGENETIQUES**

Lorsque nous nous sommes intéressés aux anomalies épigénétiques des tumeurs de l'enfant aucune étude n'avait été publiée sur l'analyse de la méthylation de l'ADN dans les épendymomes.

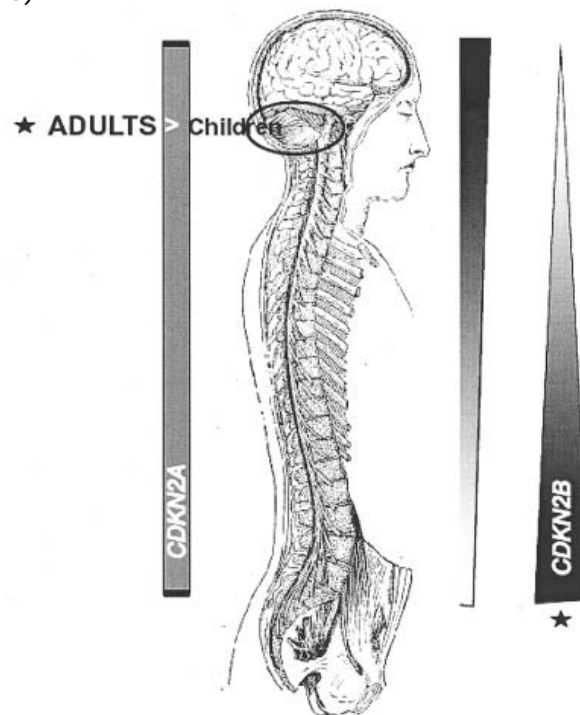
Alonso a été le premier à suggérer que l'hyperméthylation des gènes pouvait jouer un rôle important dans le développement de ces tumeurs dans une étude sur la méthylation dans différentes tumeurs du cerveau dont 7 épendymomes (Alonso, 2003). Il a confirmé ses résultats avec une deuxième série de 27 épendymomes (Alonso, 2004) où les taux de méthylation étaient de plus de 20% pour les gènes MGMT, TIMP3, THBS1 et TP73. NF2 et Caspase 8 présentaient une méthylation dans moins de 10% des cas et les régulateurs du cycle cellulaire, RB1 et p16INK4a, étaient hyperméthylés dans 4% et 18% des échantillons, respectivement. Dans cette série, 14 patients étaient des adultes et 13 des enfants. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre ces deux groupes.

Des études ultérieures ont démontré une relation entre la localisation de la tumeur, l'âge du patient et le profil de méthylation. Ainsi, Rousseau et al. (2003) ont trouvé des pourcentages de méthylation du promoteur du gène CDKN2A significativement différents entre les tumeurs des adultes et les tumeurs pédiatriques ( $p = 0.043$  pour CDKN2A) (Figure 21) (Rousseau, 2003).



**Figure 21. Représentation schématique des variations de méthylation dans les tumeurs épendymales.**

Pour *CDKN2A*, pas de différence craniocaudal dans la fréquence de méthylation et dans les tumeurs cérébrales les tumeurs des adultes ont été plus méthylées que les pédiatriques. \* $P < 0.05$  (test du chi- carré)



*D'après Rousseau et al, 2003.*

En 2005, Hamilton et al ont étudié le statut de méthylation de neuf gènes (*RASSF1A*, *CASP8*, *MGMT*, *RB1*, *p14 (ARF)*, *p15 (INK4B)*, *p16 (INK4A)*, *TP73* et *TIMP3*) dans une petite série de 20 épendymomes dont 11 pédiatriques. *RASSF1A* est très fréquemment méthylé (85%); *CASP8*, *MGMT* et *TP73* sont beaucoup moins méthylés alors qu'aucune méthylation n'a été détectée pour *p14*, *p15*, *p16*, *Rb1* et *TIMP3*. L'association entre *CASP8* et le sous type histologique montrait une tendance à la signification : toutes les tumeurs qui présentaient une méthylation de *CASP8* étaient des variantes myxopapillaires.

## **2.4. TRAVAIL DE RECHERCHE**

Les épendymomes sont des tumeurs pour lesquelles aucun marqueur biologique n'est disponible à l'heure actuelle et qui sont très résistantes aux traitements non chirurgicaux (chimio ou radiothérapie). Notre intention était de caractériser des marqueurs épigénétiques qui puissent nous aider pour le diagnostic initial ou la détection précoce d'une rechute et, dans le cas où cette altération serait fréquente, ouvrir la possibilité d'un traitement dirigé contre ces anomalies.

Nos hypothèses initiales étaient :

1. qu'un des mécanismes d'inactivation du chromosome 22 dans les épendymomes des enfants pourrait être l'hyperméthylation des gènes suppresseurs des tumeurs situées sur ce chromosome (INI1, NF2, TIMP3, EP300) en association avec les délétions;
2. que les épendymomes des enfants présentent un profil épigénétique particulier, différent de ce qui est décrit chez les adultes;
3. que p53 joue également un rôle dans la carcinogenèse de ces tumeurs.

Nos objectifs étaient, donc, dans la première étude de décrire un profil de méthylation spécifique des épendymomes de l'enfant. Pour cela, vingt-sept épendymomes intracrâniens et sept papillomes du plexus choroïde ont été étudiés et comparés au tissu cérébral normal. Nous avons analysé des gènes fréquemment méthylés dans les tumeurs solides ainsi que les gènes suppresseurs de tumeur situés spécifiquement sur le chromosome 22. Puis, nous avons recherché s'il existe une relation significative entre la méthylation d'un de ces gènes ou le nombre de gènes méthylés et la réponse au traitement ou la survie de ces patients.

Dans la deuxième étude, réalisée en collaboration avec l'équipe de J. Grill à l'institut Gustave Roussy nous avons étudié la méthylation de p53 dans des épendymomes primitives au moment du diagnostic et ou de la rechute aussi bien que dans deux xénogreffes, et sa relation avec la résistance au traitement.

### **2.4.1. La méthylation des gènes suppresseurs dans les épendymomes intracrâniens de l'enfant**

#### ***I. Publication n. 1***

Méthylation of *RASSF1A* and TRAIL pathway related genes is frequent in childhood intracranial ependymomas and benign choroid plexus papilloma.

Michalowski MB, Fraipont F, Michelland S, Entz-Werle N, Grill J, Pasquier B, Favrot MC, Plantaz D.

Cancer Genet Cytogenet 166(1):74-81, 2006.

## **II. Résumé**

Les épendymomes (EP) représentent la troisième plus fréquente tumeur du système nerveux central de l'enfant, après les astrocytomes et les médulloblastomes. L'intérêt de l'étude de cette tumeur repose sur deux points principaux : 1. à ce jour il ne présente pas de marqueur biologique diagnostique ou pronostique ; 2. la différenciation entre les épendymomes et les papillomes du plexus choroïde (PPC) peut être parfois cliniquement difficile.

Nos objectifs étaient de décrire et comparer le profil de méthylation de 19 gènes (p15INK4a (CDKN2B), p16INK4a et p14ARF (le deux CDKN2A), APC, RB1, RASSF1A, BLU (ZMYND10) FHIT, RARB, MGMT, DAPK (DAPK1), ECAD (CDH1), CASP8, TNFRSF10C, TNFRSF10D, FLIP (CFLAR), INI1 (SMARCB1), TIMP3, et NF2) par MSP dans une série de 27 épendymomes intracrâniens de l'enfant et 7 papillomes du plexus choroïde. Trois cortex adultes obtenus par de chirurgie de l'épilepsie ont été utilisés comme contrôles.

Nous avons observé un pourcentage similaire de méthylation dans les deux groupes de tumeurs (71% dans les PPC et 77% dans les EP). Aucune méthylation n'a été observée dans le groupe contrôle. RASSF1A était le gène le plus fréquemment méthylé aussi bien dans les tumeurs bénignes (66%) que dans les EP (56%). Les gènes associés à l'apoptose étaient aussi méthylés dans les deux groupes de tumeurs. Les pourcentages de méthylation des gènes de la voie TRAIL (CASP8, TNFRSF10C, et TNFRSF10D) étaient de respectivement 30, 9,5, et 36,4%, dans les EP ; et de 50, 50, et 16,7%, dans les PPC. Aucun autre gène n'était méthylé dans les tumeurs bénignes. Par contre FHIT était méthylé dans 22%, RARB dans 14,8%, BLU dans 13,6%, p16INK4a dans 11,1%, TNFRSF10C dans 9,5%, et DAPK dans 7,4% des épendymomes.

Nous n'avons pas retrouvé de relation statistiquement significative entre une méthylation individuelle et le pronostic, mais le panel de gènes méthylés dans les épendymomes semble ne pas être distribué de façon aléatoire et peut représenter un mécanisme de développement et d'évolution tumorale.



# Methylation of *RASSF1A* and TRAIL pathway-related genes is frequent in childhood intracranial ependymomas and benign choroid plexus papilloma

Mariana Bohns Michalowski<sup>a</sup>, Florence de Fraipont<sup>a</sup>, Sylvie Michelland<sup>a</sup>,  
Natascha Entz-Werle<sup>b</sup>, Jacques Grill<sup>c</sup>, Basile Pasquier<sup>d</sup>, Marie-Christine Favrot<sup>a,\*</sup>,  
Dominique Plantaz<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Centre d'Innovation en Biologie, Département de Biologie Intégrée–Pavillon B, Centre Hospitalier Universitaire de la Tronche, Grenoble–38043, France

<sup>b</sup>Centre Hospitalier de Strasbourg, France

<sup>c</sup>Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

<sup>d</sup>Service d'Anatomopathologie, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, France

<sup>e</sup>Service de Pédiatrie, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, France

Received 12 July 2005; received in revised form 8 September 2005; accepted 9 September 2005

## Abstract

Ependymomas (EP) represent the third most frequent type of central nervous system (CNS) tumor of childhood, after astrocytomas and medulloblastomas. No prognostic biological markers are available, and differentiation from choroid plexus papilloma (CPP) is difficult. The present objective was, for a sample of 27 children with intracranial EP and 7 with CPP, to describe and compare the methylation status of 19 genes (with current HUGO symbol, if any): *p15INK4a* (*CDKN2B*), *p16INK4a* and *p14ARF* (both *CDKN2A*), *APC*, *RB1*, *RASSF1A* (*RASSF1*), *BLU* (*ZMYND10*) *FHIT*, *RARB*, *MGMT*, *DAPK* (*DAPK1*), *ECAD* (*CDH1*), *CASP8*, *TNFRSF10C*, *TNFRSF10D*, *FLIP* (*CFLAR*), *INII* (*SMARCB1*), *TIMP3*, and *NF2*. Three adult corteses were used as a control. We detected a similar percentage of methylated tumors in both groups (71% in CPP and 77% in EP). No gene was methylated in that control group. *RASSF1A* was the most frequently methylated gene in both benign tumors (66%) and EP (56%). The genes associated with apoptosis were methylated in both groups of tumors. The percentages of TRAIL pathway genes (*CASP8*, *TNFRSF10C*, and *TNFRSF10D*) methylated were 30, 9.5, and 36.4%, respectively, in ependymomas and 50, 50, and 16.7%, respectively, in choroid plexus papillomas. No other gene was methylated in the benign tumors, whereas *FHIT* was methylated in 22%, *RARB* in 14.8%, *BLU* in 13.6%, *p16INK4a* in 11.1%, *TNFRSF10C* in 9.5%, and *DAPK* in 7.4% of ependymomas. Although we did not observe a statistical relationship between methylation and clinical outcome, the methylation pattern does not appear to be randomly distributed in ependymoma and may represent a mechanism of tumor development and evolution. © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Ependymomas, glial neoplasms that develop from ependymal cells lining the cerebral ventricles and the central canal of the spinal cord, are the third most frequent type of tumor of the central nervous system (CNS) in childhood, after astrocytomas and medulloblastomas. Most pediatric ependymomas develop in the ventricles, and they are

difficult to differentiate from choroid plexus tumors diagnostically. Furthermore, the pathogenesis and the genetic abnormalities of ependymomas are poorly characterized, and biological markers of prognostic or diagnostic value are not yet available. Multiple genomic imbalances have been described in cytogenetic and comparative genomic hybridization analyses, including partial or total loss of chromosomes (1p, 4q, 6q, 9, 10, 11, 13, 16, 17, 19q, 20q, and 22q). In 40% of childhood ependymomas, however, no chromosomal imbalances can be detected [1,2]. The most frequent alterations are loss of 22q and 6q. These anomalies are present in ~23 and ~15%, respectively, of all childhood

\* Corresponding author. Tel.: +33-(0)-476.76.51.47; fax: +33-(0)-476.76.56.64.

E-mail address: MCFavrot@chu-grenoble.fr (M.-C. Favrot).

ependymomas analyzed [3–6]. In addition to point mutations or gene deletions, transcriptional repression by hypermethylation of promoter sequences is an alternative mechanism of inactivation of tumor-suppressor genes in cancer [7,8]. Thus, tumors can present a mutation in one allele of a gene with the other allele hypermethylated, leading to its functional inactivation [9,10]. This silencing can be partially relieved by demethylation of the promoter region [11–13].

In the present study, our hypothesis was that epigenetic alterations may be involved in tumorigenesis and aggressiveness of ependymomas. Methylation profile was analyzed in 27 children with malignant intracranial ependymomas and 7 with benign choroid plexus papilloma. A total of 19 genes were analyzed: 9 well-characterized tumor suppressor genes involved in cell-cycle regulation (*p15* or *p15INK4a*, *p16* or *p16INK4a*, *p14* or *p14ARF*, *APC*, *RBI*, *RASSF1A*, *BLU*, *FHIT*, *RARB*), one DNA repair gene (*MGMT*), two genes related to metastasis and invasion (*DAPK*, *ECAD*), three tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) pathway genes (*CASP8* and the receptors *TNFRSF10C* and *TNFRSF10D*), and one more, the negative regulator *CASP8* (*FLIP*). (For ease of reference across the literature, alternative gene symbols are given in Table 1.)

These genes were chosen because they were previously described as methylated in oligodendrogliomas and ependymomas [14], as well as in other adult cancers. A more specific study on genes located on chromosome 22 (*INI1*, *TIMP3*, *NF2*) was also performed, because loss of this chromosome is the most frequently described abnormality in ependymomas, suggesting that one or more genes located in this region may be related to genesis of this tumor [15,16]. Hypermethylation of *RASSF1A* and hypermethylation of the genes implicated in the TRAIL pathway were found to be very frequent abnormalities in both ependymomas and benign plexus choroid tumors. Here we will discuss the implications of this and related findings for the diagnosis and prognosis of ependymomas.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients and tumor specimens

We evaluated 27 intracranial ependymomas (WHO grade II) and 7 choroid plexus papillomas from children aged from 8 to 156 months (median 51 months); 57% were girls and 43% were boys. The median follow-up time was 54 months (range 3–120 months). We also evaluated three normal cortexes from adults.

The specimens were obtained after epilepsy surgery; all patients signed an informed consent. All ependymomas were intracranial. Tumor tissues obtained from surgery were frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Only fragments that were  $\geq 80\%$  tumoral were used for analysis. All tumors were evaluated for genetic abnormalities by comparative genomic hybridization. Of the

30 patients, 20 had been investigated previously: 13 ependymomas and 7 choroid plexus papillomas [4].

### 2.2. Analysis of methylation

DNA was extracted according to standard protocols [4]. Methylation patterns in the CpG island were determined by chemical modification of unmethylated cytosines to uracil, leaving methylated CpGs intact. One microgram of genomic DNA modified by treatment with bisulfite was purified using the CpGenome DNA modification kit (Qbiogene, Illkirch, France). Methylation-specific polymerase chain reaction (PCR) was then performed with specific primers for either methylated or the modified unmethylated DNA in a thermal cycler (4 min of denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$ , followed by 35 cycles of 30 sec at  $95^{\circ}\text{C}$ , 30 sec at the annealing temperature, and 30 sec at  $72^{\circ}\text{C}$ ), followed by a final 4-min extension at  $72^{\circ}\text{C}$  (Table 1). The primers and annealing temperatures have been described previously (Table 1). A relationship between methylation and genetic expression of the genes studied has been described previously. Amplification with MyoD as template, with primers selected to target in a region without CpG islands, served as control for sufficient quantity of DNA.

Controls without DNA were also used for each set of methylation-specific PCR assays. DNA from normal peripheral leukocytes was used as negative control and DNA from normal leukocytes subjected to Sss1 methyltransferase treatment (New England BioLabs, Beverly, MA) was used as a positive control. PCR products were analyzed on 2.5% agarose gels and visualized after staining with ethidium bromide. If an amplicon for both U- and M-primer or for M-primer alone could be seen, the gene promoter was considered to be methylated. Each PCR was performed twice. The procedure was repeated in entirety, starting from the bisulfite treatment, if the positive and negative controls were not correct.

## 3. Results

### 3.1. Clinical and pathological features of the tumor series

All 7 of the choroid plexus papillomas were completely resected and no recurrence was observed.

Of the 27 ependymomas (WHO grade II), 63% of these tumors were completely resected initially; 15 ependymomas recurred after the initial treatment, and 45% of the children who had an ependymoma died. After relapse or when surgery was not satisfactory, some children were treated with chemotherapy (protocol BB-SFOP), posterior fossa radiotherapy, or both. These data were in part described by Grill et al. [4]. Only one patient presented a hypermethylation of *MGMT*. Unfortunately, he relapsed after complete resection and died 8 months after diagnostic. No relationship between this epigenetic alteration and clinical evolution or response to chemotherapy was possible.

Table 1

Methylated and unmethylated gene-specific primers, annealing temperature, and PCR product sizes used for methylation-specific PCR

Gene— methylation	Alternative gene symbol <sup>a</sup>	Sense primer, 5'–3'	Antisense primer, 5'–3'	Product size, bp	Annealing temperature, °C	Reference
APC–U		AAACCAAAACACTCCCCATTC	AGTTATATGTTGGTTATGTGTGTTTAT	76	60	Eads et al., 2001 [32]
APC–M		GAACCAAAACGCTCCCCAT	TTATATGTCGGTTACGTGCGTTTATAT	74	65	Eads et al., 2001 [32]
BLU–U	ZMYND10	TTTGTGGGTTATAGTTTGAGAAAAGTG	AACAAATTAACCACACCTACAC	233	(See ref.)	Hesson et al., 2004 [26]
BLU–M	ZMYND10	TTCGTGGGTTATAGTTCGAGAAAAGCG	AACGAATTAACCGCCTACGC	233	(See ref.)	Hesson et al., 2004 [26]
CASP8–U		TAGGGGATTGGAGATTGTGA	CCATATATATCTACATTCAAAACAA	321	50	Gonzalez-Gomez et al., 2003 [33]
CASP8–M		TAGGGGATTCCGAGATTGCGA	CGTATATCTACATTCGAAACGA	322	58	Gonzalez-Gomez et al., 2003 [33]
DAPK–U	DAPK1	GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	CAAATCCCTCCCAACACCAA	106	60	Gonzalez-Gomez et al., 2003 [33]
DAPK–M	DAPK1	GGATAGTCGGATGTTAACGTC	CCCTCCCAACGCGCA	98	60	Gonzalez-Gomez et al., 2003 [33]
ECAD–U	CDH1	TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT	CACAACCAATCAACAACACA	97	57	Zochbauer-Muller et al., 2001a [34]
ECAD–M	CDH1	TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT	TAATAAAAATTACCTACCGAC	115	57	Zochbauer-Muller et al., 2001a [34]
EP300–U		TTGTTGTATATATTTTTATTGTGG	AACCAATACTAAAACACCCA	145	55	
EP300–M		TCGTTCTGATATATTTTTATCGCG	GACCAATACTAAAACGCCCCG	145	55	
FHIT–U		TTGGGGTGTGGGTTTGGGTTTTATG	CATAAACAACACCAACCCCACTA	74	64	Zochbauer-Muller et al., 2001b [35]
FHIT–M		TTGGGGCGCGGGTTTTACGC	CGTAAACGACGCGCAACCCACTA	74	64	Zochbauer-Muller et al., 2001b [35]
FLIP–U	CFLAR	TGG TTA TTT GTA GTT TTT TGG AGT	AAT AAC AAC AAC AAA AAA ATC CA	211	50	van Noesel et al., 2003 [36]
FLIP–M	CFLAR	GTT ATT TGT AGT TTT TCG GAG C	CAA CGA CAA AAA AAT CCG	203	58	van Noesel et al., 2003 [36]
IN11–U	SMARCB1	GTTTTGGTTTTTTTTGGTTTAGTATGT	TCAAAACCAATCATATAAACTCACC	186	60	Sevenet et al., 1999 [30]
IN11–M	SMARCB1	TTTCGGTTTTTTTTCGGTTTAGTAC	GAAACCGATCATATAAACTCGC	183	60	Sevenet et al., 1999 [30]
MGMT–U		TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT	AACTCCACACTTTCAAAAACAAAAACA	93	55	Gonzalez-Gomez et al., 2003 [33]
MGMT–M		TTTCGAACGTTCTGATGTTTTTCGC	GCATCTTCCGAAAAACGAAACG	81	55	Gonzalez-Gomez et al., 2003 [33]
NF2–U		GTGGAGTTATTTTAAAGGAGGT	TAACACAACCAAAACAAAACTAA	107	58	Kino et al., 2001 [37]
NF2–M1		GAGTTATTTTAAAGGAGGCGGGAC	AAACTAACGCATAAATACTACG	125	53	Kino et al., 2001 [37]
NF2–M2		TAAAGGAGGCGGGACGGAGC	ACGCAACCGAACCGAAAACTAACG	120	60	Kino et al., 2001 [37]
P14–U	CDKN2A	TTTTTGGTGTTAAAGGGTGGTGTAGT	CACAAAAACCTCACTACAACAA	132	60	Zochbauer-Muller et al., 2001a [34]
P14–M	CDKN2A	GTGTTAAAGGGCGGCGTAGC	AAAACCTCACTCGCGACGA	122	60	Zochbauer-Muller et al., 2001a [34]
P15–U	CDKN2B	TGTGATGTGTTGTATTTGTGGTT	CCATACAATAACCAAAACACAA	154	60	Rousseau et al., 2003 [29]
P15–M	CDKN2B	GCGTTCGTAITTTGCGGTT	CGTACAATAACCGAACGACCGA	148	60	Rousseau et al., 2003 [29]
P16–U	CDKN2B	GGTTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CCCAACCCCAAAACCACAACCATAA	151	60	Gonzalez-Gomez et al., 2003 [33]
P16–M	CDKN2B	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCGAACCGGACCGTAA	151	65	Gonzalez-Gomez et al., 2003 [33]
RASSF1A–U	RASSF1	TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG	CAAACCCCAAACTAAAAACAA	105	60	Wong et al., 2004 [22]
RASSF1A–M	RASSF1	GTGTTAACGCGTTGCGTATC	AACCCCGGAACATAAAAAACGA	93	60	Wong et al., 2004 [22]
RARB–U		TTGAGAATGTGAGTGATTGA	AACCAATCCAACCAAAAAACA	146	59	Virmani et al., 2000 [38]
RARB–M		TCCGAGACGCGAGCTTCC	GACCAATCCAACCGAAACGA	146	59	Virmani et al., 2000 [38]
RB1–U		GGGAGTTTTGTGGATGTGAT	ACATCAAAAACACACCCCA	172	58	Gonzalez-Gomez et al., 2003 [33]
RB1–M		GGGAGTTTCGCGGACGTGAC	ACGTCGAAACACGCCCCG	172	66	Gonzalez-Gomez et al., 2003 [33]
TIMP3–U		TGTGTGGAGGTTAAGGTTGTTTT	ACTCTCAAAAATTACCATACACACC	116	60	Eads et al., 2001 [32]
TIMP3–M		GCGTCGGAGGTTAAGGTTGTT	CTCTCAAAAATTACCGTACGCG	116	60	Eads et al., 2001 [32]
TNFRSF10C–U		GAATTTTTTATGTGTATGAATTTAGTTAAT	CCATCAAAACAACCAAAAAACA	125	52	van Noesel et al., 2002 [39]
TNFRSF10C–M		TTACGCGTACGAATTTAGTTAAC	ATCAACGACCGACCGAAACG	123	50	van Noesel et al., 2002 [39]
TNFRSF10D–U		TTGGGGATAAAGTGTTTTGATT	AAACCAACAACAAAACCAACA	138	60	van Noesel et al., 2002 [39]
TNFRSF10D–M		GGGATAAAGCGTTTCGATC	CGACAACAAAACCGCG	145	60	van Noesel et al., 2002 [39]

Abbreviations: bp, base pairs; M, methylated; PCR, polymerase chain reaction; U, unmethylated.

<sup>a</sup> Multiple gene symbols appear in the literature. For clarity, current alternative gene symbols are given, based on the Human Genome Nomenclature Committee's HUGO database (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>).



We observed a statistically significant relationship in the ependymoma group between age and prognosis ( $P < 0.01$ ).

### 3.2. Frequency of methylation of tumor suppressor genes

The methylation status of 19 gene promoter regions was determined (Fig. 1). The specificity and sensitivity of methylation-specific PCR were determined on samples after serial dilution of methylated DNA in unmethylated DNA. Methylation-specific PCR sensitivity is  $<1\%$  of methylated DNA, as previously described [17]. Amplification of MyoD using primers selected to target an unmethylated region confirmed the integrity of the DNA in samples (Fig. 1).

We observed no methylation in the three normal cortexes (data not shown).

In choroid plexus papillomas, six of the seven tumors studied had at least one methylated gene (range 1–4) (Table 2). We observed frequent methylation of genes associated with the TRAIL pathway: *CASP8* (50%), *TNFRSF10C* (50%), and *TNFRSF10D* (17%) and of the *RASSF1A* gene (67%). All other genes (*FHIT*, *RARB*, *BLU*, *p14*, *p15*, *p16*, *DAPK*, *MGMT*, *APC*, *ECAD*, *FLIP*, *RBI*, *TIMP3*, *INII*, and *NF2*) were nonmethylated in these benign tumors.

In our ependymoma series, 21 out of 27 tumors studied showed at least one methylated gene (range 1–7; median 2). *RASSF1A* was the most frequently methylated gene (56.5%), followed by *TNFRSF10D* (36%) and *CASP8* (30%). *FHIT* was methylated in 22% of ependymomas. *RARB* was methylated in 14.8% of cases, *BLU* in 13.6%, *p16* in 11.1%, *TNFRSF10C* in 9.5%, and *DAPK* in 7.4%. Only one case each of methylation of *MGMT* and *APC* was observed in the 27 ependymomas tested, and no methylation of *ECAD*, *p14*, *p15*, *FLIP*, *RBI*, *TIMP3*, *INII*, or *NF2* (Table 2). The analysis of some genes was not possible, because not enough DNA was available (marked NS in Table 2).

We did not find a statistically significant difference between the methylation profile of the two groups of tumors (ependymomas and choroid plexus papilloma) or a significant relationship between methylation and clinical evolution or deletion 22q in ependymomas. Children who showed a tumor progression after initial treatment had a median of 2 methylated genes (minimum 0, maximum 7), as did children who were cured (minimum 0, maximum 4).

## 4. Discussion

Several studies have identified age and extent of the resection as significant prognostic variables. Here we describe the methylation status of 19 genes in 27 intracranial childhood ependymomas and 7 choroid plexus papillomas. To our knowledge, this is the largest study of hypermethylation of tumor suppressor genes in intracranial childhood ependymoma, and the first study to compare an ependymoma group with a benign tumor group in this context.

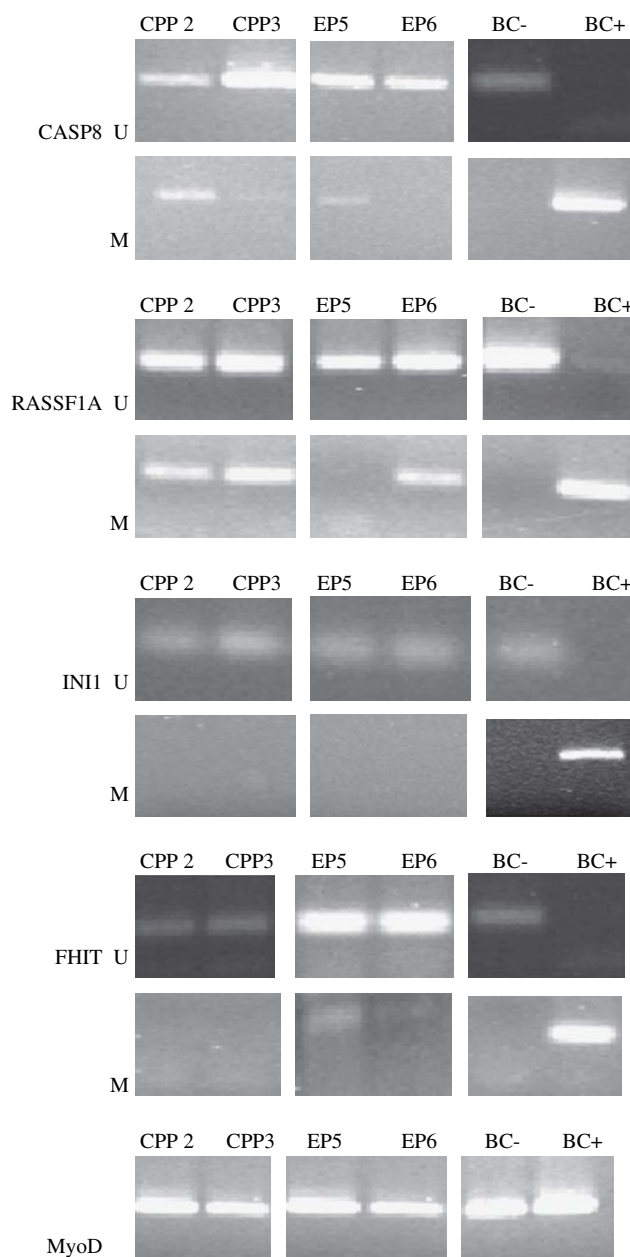


Fig. 1. Methylation analysis of *CASP8*, *INII*, *FHIT*, and *RASSF1A* genes in ependymomas (EP) or choroid plexus papilloma (CPP). MyoD: amplification with primers selected in an unmethylated region which is used as a DNA quantity control. BC– and BC+: DNA extracted from buffy coat and used as negative control (–) or as positive control (+) after SS1 methylation in vitro. U: amplification with unmethylated gene-specific primers. M: amplification with methylated gene-specific primers.

Choroid plexus papillomas are rare benign intracranial neoplasms of the choroid plexus, a neuroepithelial-lined papillary projection of the ventricular ependyma. In the pediatric age group, papillomas are not easily differentiated from ependymomas, because they have similar localizations. The former occur most commonly in the lateral ventricle (67%), followed by the fourth ventricle (19%), with a lesser number presenting primarily in the third ventricle (14%) [18].

Table 2  
Frequency of aberrant gene methylation and 22q deletion

Sample	CASP8	TNFRSF10C	TNFRSF10D	RASSF1A	FHIT	RARB	BLU	P16	DAPK	MGMT	APC	ECAD	P14	P15	FLIP	RB1	TIMP3	INI1	NF2	-22q
EP 1	—	—	[m]	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EP 2	[m]	—	—	—	—	—	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EP 3	—	—	—	—	—	[m]	—	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	[m]
EP 4	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	[m]
EP 5	[m]	—	—	—	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EP 6r	—	—	[m]	[m]	[m]	—	[m]	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EP 7	—	—	—	—	—	—	—	—	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EP 8	—	—	—	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EP 9	—	[m]	[m]	[m]	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EP 10	—	—	[m]	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EP 11	[m]	—	—	[m]	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EP 12	NS	NS	[m]	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	NS	—	—	—	—	—
EP 13r	NS	NS	NS	NS	—	[m]	NS	—	—	—	[m]	—	—	—	NS	—	—	—	—	—
EP 14	[m]	—	—	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	[m]
EP 15r	—	—	[m]	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EP 16r	NS	NS	NS	NS	—	—	NS	—	—	—	—	—	—	—	NS	—	—	—	—	—
EP 17	[m]	—	—	[m]	[m]	[m]	[m]	[m]	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EP 18	NS	NS	NS	NS	—	—	NS	—	—	—	—	—	—	—	NS	—	—	—	—	[m]
EP 19	NS	NS	NS	NS	—	—	NS	—	—	[m]	—	—	—	—	NS	—	—	—	—	—
EP 20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EP 21	—	[m]	—	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EP 22	—	—	[m]	[m]	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EP 23	NS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	[m]
EP 24	—	—	[m]	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EP 25	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EP 26	—	—	—	—	—	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EP 27	NS	NS	NS	—	—	—	NS	—	—	—	—	—	—	—	NS	—	—	—	—	—
EP total (%)	6 (30)	2 (9.5)	8 (36.4)	13 (56.5)	6 (22.2)	4 (14.8)	3 (13.6)	3 (11.1)	2 (7.4)	(3.7)	(3.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5
CPP 1	NS	NS	NS	NS	—	—	NS	—	—	—	—	—	—	—	NS	—	—	—	—	—
CPP 2	[m]	—	—	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CPP 3	[m]	[m]	[m]	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CPP 4	—	—	—	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CPP 5	—	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CPP 6	—	—	—	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CPP 7	[m]	[m]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CPP total (%)	3 (50)	3 (50)	(16.67)	4 (66.67)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Abbreviations: CPP, choroid plexus papilloma; EP, ependymoma; [m], methylated; NS, not studied; r, tumor at relapse.

For genes and alternative symbols, see Table 1.

Several studies have now reported methylation profiles in different tumor types as proof of principle for cancer risk assessment, early cancer diagnosis and prognosis, and response to chemotherapy (reviewed in [19,20]). To date, the methylation profiles of adult cancers such as breast and lung, and some cerebral tumors, have been most studied [20–22], but no large series of cerebral pediatric tumors have been described.

In our study, the *RASSF1A* gene located at 3p21.3 was the most frequently hypermethylated in the ependymoma series (56%). We observed a comparable percentage of methylation of this gene in our benign tumors (66%). The TRAIL pathway genes (*CASP8*, *TFRSF10C*, and *TFRSF10D*) were also frequently methylated in ependymomas (30, 9.5, and 36.4%, respectively) and in choroid plexus papillomas (50, 50, and 16.7%, respectively). In the literature, the study by Alonso et al. [23] described only one methylation of the *CASP8* gene amongst the 27 ependymomas tested. The differences seen are probably due to the heterogeneous populations studied and histological differences (ependymomas of WHO grade II versus III; frozen tissue as opposed to paraffin-embedded tumors).

Note that the genes that were methylated in both groups of tumors are mainly associated with apoptosis. This finding may be explained by the regulatory role of these genes in cellular replication and cellular death control in the development of both benign and malignant tumors. We did not observe any methylation of genes associated with invasion and metastases in benign tumors. Genetic hypermethylation in benign tumors or normal tissues has rarely been described. One study describes hypermethylation of *RASSF1A* and *RARB* in nonmalignant proliferation of breast epithelium [24].

*FHIT* was methylated in 22% of the ependymomas studied and in none of the choroid plexus papillomas. As can be seen from the literature, *FHIT* is inactivated in 60% of human tumors (range 20–100%, depending on tumor type); this figure makes *FHIT* the most commonly altered gene in human cancer [25]. Several recent studies have provided support for the tumor-suppressor activity of *FHIT*. The exact molecular mechanism or functional pathway of *FHIT* action is still unknown, but it may play a role in the early stages of cancer development.

The *RARB* and *BLU* genes were methylated in 14.8 and 13.6%, respectively, of all ependymomas tested and in none of the choroid plexus papillomas. These methylations were described mainly in adult cancers such as breast cancer [13] and gliomas [26], which implicates *RASSF1A* and *BLU* promoter methylation in the pathogenesis of adult gliomas [26].

Loss of expression of the *p16* gene, often associated with aberrant methylation, was observed not only in astrocytic tumors but also in oligodendroglial tumors [27,28]. Note that only 3 out of 27 childhood ependymomas showed a hypermethylation of this gene (11%). This result is comparable to some data available in the literature [23], but discordant with other data that describe no methylation of

the gene *p16* in posterior fossa ependymomas grade II WHO in children [29]. In the latter study, by Rousseau et al. [29], *p14* and *p15* are methylated in ~10 and ~20% of the pediatric posterior fossa ependymomas. These differences may be due to histological differences (different pathology center, paraffin versus frozen tissue) or simply because series of childhood intracranial ependymomas are still too small and limited to allow a complete view of the complex epigenetic anomalies.

Because chromosome 22 has been described as the one most often deleted in childhood ependymomas, we supposed that this region contains tumor suppressor genes involved in ependymomas formation. The *INI1* gene, located on chromosome segment 22q11.2, has been implicated in transcriptional activation and repression. It is mutated in early childhood rhabdoid tumors and in various malignancies of the central nervous system [30]. The *NF2* gene, located at 22q12, is frequently inactivated in sporadic cord forms and several studies have investigated the possibility that the *NF2* gene may be the candidate tumor suppressor in ependymomas. The hypermethylation of this gene has been observed in 7% of ependymomas [23]. We also tested *TIMP3*, which is an angiogenesis inhibitor that has been found to be methylated in 33% of ependymomas [23]. In our study, no hypermethylation was detected in these three genes, all of which are located on chromosome 22. Moreover, the differences between our results and those already published may be explained by the small number of tumors studied, the heterogeneity of the groups (adult and child tumors), and the status of chromosome 22 in these tumors. In our series, only 5 of the 27 ependymomas showed a 22q deletion.

*DAPK*, *MGMT*, and *APC* were rarely methylated in our series and *p14*, *p15*, *FLIP*, and *RBI* were never methylated (Table 2). We observed some differences between our results and the results obtained previously for adult ependymomas, mainly for *MGMT*, *DAPK*, and *p14* genes [23]. This may suggest that childhood ependymomas and tumors with different localization represent different entities with different methylation profiles.

We did not find a statistically significant difference between gene methylation in ependymomas and choroid plexus papillomas, although some genes were never methylated in the benign tumor group. This is probably due to the small number (seven) of tumors studied in the benign tumor group.

In addition, we were unable to evaluate whether methylation and deletion are coexistent, as proposed by Knudson [31], because only a small sample of our tumors presented a 22q deletion and no tumor showed methylation of 22q genes.

This analysis also suggests that a low percentage of ependymomas are hypermethylated at the *MGMT* promoter. We could not establish a relationship between this methylation and response to chemotherapy because the only patient who was *MGMT* hypermethylated presented a very

rapid tumor progression. Clinical trials with *MGMT*-modulating agents may have a role in the treatment of these tumors and, although a relationship between hypermethylation and clinical presentation and evolution was not established, the epigenetic alterations could be used in the future for differential diagnosis and detection of tumor regrowth (e.g., by a methylation-based molecular diagnostic assay in the cerebrospinal fluid).

In the present study, we tried to define a methylation profile in childhood intracranial ependymomas. We observed that the methylation pattern seems not to be randomly assigned in ependymomas, and may represent a mechanism of tumor development and evolution. Tracing the methylation profile offers the advantages of early detection, differential diagnosis, and detection of tumor regrowth by a methylation-based molecular diagnostic assay. In future studies, it will be of interest to test different genes, located in commonly deleted regions, in larger and comparative series.

### Acknowledgments

Financial support for this work was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Ministério da Ciência e Tecnologia, Brazil.

### References

- Ward S, Harding B, Wilkins P, Harkness W, Hayward R, Darling JL, Thomas DG, Warr T. Gain of 1q and loss of 22 are the most common changes detected by comparative genomic hybridisation in paediatric ependymoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;32:59–66.
- Carter M, Nicholson J, Ross F, Crolla J, Allibone R, Balaji V, Perry R, Walker D, Gilbertson R, Ellison DW. Genetic abnormalities detected in ependymomas by comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer* 2002;86:929–39.
- Ransom DT, Ritland SR, Kimmel DW, Moertel CA, Dahl RJ, Scheithauer BW, Kelly PJ, Jenkins RB. Cytogenetic and loss of heterozygosity studies in ependymomas, pilocytic astrocytomas, and oligodendrogliomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1992;5:348–56.
- Grill J, Avet-Loiseau H, Lellouch-Tubiana A, Sevenet N, Terrier-Lacombe MJ, Venuat AM, Doz F, Sainte-Rose C, Kalifa C, Vassal G. Comparative genomic hybridization detects specific cytogenetic abnormalities in pediatric ependymomas and choroid plexus papillomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;136:121–5.
- Jeuken JW, Sprenger SH, Gilhuis J, Teepe HL, Grotenhuis AJ, Wesseling P. Correlation between localization, age, and chromosomal imbalances in ependymal tumours as detected by CGH. *J Pathol* 2002;197:238–44.
- Dyer S, Prebble E, Davison V, Davies P, Ramani P, Ellison D, Grundy R. Genomic imbalances in pediatric intracranial ependymomas define clinically relevant groups. *Am J Pathol* 2002;161:2133–41.
- Belinsky SA. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:707–17.
- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042–54.
- Knudson AG. Chasing the cancer demon. *Annu Rev Genet* 2000;34:1–19.
- Myohanen SK, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation can selectively silence individual *p16ink4A* alleles in neoplasia. *Cancer Res* 1998;58:591–3.
- Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000;16:168–74.
- Dong SM, Sun DI, Benoit NE, Kuzmin I, Lerman MI, Sidransky D. Epigenetic inactivation of *RASSF1A* in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:3635–40.
- Yang Q, Shan L, Yoshimura G, Nakamura M, Nakamura Y, Suzuma T, Umemura T, Mori I, Sakurai T, Kakudo K. 5-aza-2'-deoxycytidine induces retinoic acid receptor beta 2 demethylation, cell cycle arrest and growth inhibition in breast carcinoma cells. *Anticancer Res* 2002;22:2753–6.
- Alonso ME, Bello MJ, Gonzalez-Gomez P, Arjona D, Lomas J, de Campos JM, Isla A, Sarasa JL, Rey JA. Aberrant promoter methylation of multiple genes in oligodendrogliomas and ependymomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;144:134–42.
- Mitelman F. Catalog of chromosomes aberrations in cancer. 4th ed. New York: Alan R. Liss, 1991 [Quarterly updates available from <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>].
- Rogatto SR, Casartelli C, Rainho CA, Barbieri-Neto J. Chromosomes in the genesis and progression of ependymomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1993;69:146–52.
- de Fraipont F, Moro-Sibilot D, Michelland S, Brambilla E, Brambilla C, Favrot MC. Promoter methylation of genes in bronchial lavages: a marker for early diagnosis of primary and relapsing non-small cell lung cancer? *Lung Cancer* 2005;50:199–209 [Epub July 25, 2005].
- Agarwal A, Chopra S, Sehgal AD. Choroid plexus papilloma associated with developmental delay. *Indian J Pediatr* 2004;71:763–6.
- Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:687–92.
- Topaloglu O, Hoque MO, Tokumaru Y, Lee J, Ratovitski E, Sidransky D, Moon CS. Detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor and bronchoalveolar lavage of patients with lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:2284–8.
- Chan MW, Chan LW, Tang NL, Lo KW, Tong JH, Chan AW, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM, To KF. Frequent hypermethylation of promoter region of *RASSF1A* in tumor tissues and voided urine of urinary bladder cancer patients. *Int J Cancer* 2003;104:611–6.
- Wong IH, Chan J, Wong J, Tam PK. Ubiquitous aberrant *RASSF1A* promoter methylation in childhood neoplasia. *Clin Cancer Res* 2004;10:994–1002.
- Alonso ME, Bello MJ, Gonzalez-Gomez P, Arjona D, de Campos JM, Gutierrez M, Rey JA. Aberrant CpG island methylation of multiple genes in ependymal tumors. *J Neurooncol* 2004;67:159–65.
- Pu RT, Laitala LE, Alli PM, Fackler MJ, Sukumar S, Clark DP. Methylation profiling of benign and malignant breast lesions and its application to cytopathology. *Mod Pathol* 2003;16:1095–101.
- Pekarsky Y, Zanesi N, Palamarchuk A, Huebner K, Croce CM. *FHIT*: from gene discovery to cancer treatment and prevention. *Lancet Oncol* 2002;3:748–54.
- Hesson L, Bieche I, Krex D, Criniere E, Hoang-Xuan K, Maher ER, Latif F. Frequent epigenetic inactivation of *RASSF1A* and *BLU* genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas. *Oncogene* 2004;23:2408–19.
- Costello JF, Berger MS, Huang HS, Cavenee WK. Silencing of *p16/CDKN2* expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res* 1996;56:2405–10.
- Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efrid JT, von Deimling A, Louis DN. *CDKN2/p16* or *RB* alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* 1996;56:150–3.
- Rousseau E, Ruchoux MM, Scaravilli F, Chapon F, Vinchon M, De Smet C, Godfraind C, Vikkula M. *CDKN2A*, *CDKN2B* and *p14ARF* are frequently and differentially methylated in ependymal tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2003;29:574–83.

- [30] Sevenet N, Lellouch-Tubiana A, Schofield D, Hoang-Xuan K, Gessler M, Birnbaum D, Jeanpierre C, Jouvet A, Delattre O. Spectrum of *hSNF5/INI1* somatic mutations in human cancer and genotype-phenotype correlations. *Hum Mol Genet* 1999;8:2359–68.
- [31] Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:157–62.
- [32] Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, Long TI, Kurumboor SK, Bernstein L, Peters JH, DeMeester SR, DeMeester TR, Skinner KA, Laird PW. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001;61:3410–8.
- [33] Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Lomas J, Arjona D, Alonso ME, Aminoso C, Lopez-Marin I, Anselmo NP, Sarasa JL, Gutierrez M, Casartelli C, Rey JA. Aberrant methylation of multiple genes in neuroblastic tumours: relationship with *MYCN* amplification and allelic status at 1p. *Eur J Cancer* 2003;39:1478–85.
- [34] Zochbauer-Muller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2001;61:249–55.
- [35] Zochbauer-Muller S, Fong KM, Maitra A, Lam S, Geradts J, Ashfaq R, Virmani AK, Milchgrub S, Gazdar AF, Minna JD. 5' CpG island methylation of the *FHIT* gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Res* 2001;61:3581–5.
- [36] van Noesel MM, van Bezouw S, Voute PA, Herman JG, Pieters R, Versteeg R. Clustering of hypermethylated genes in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:226–33.
- [37] Kino T, Takeshima H, Nakao M, Nishi T, Yamamoto K, Kimura T, Saito Y, Kochi M, Kuratsu J, Saya H, Ushio Y. Identification of the *cis*-acting region in the *NF2* gene promoter as a potential target for mutation and methylation-dependent silencing in schwannoma. *Genes Cells* 2001;6:441–54.
- [38] Virmani AK, Rathi A, Zochbauer-Muller S, Sacchi N, Fukuyama Y, Bryant D, Maitra A, Heda S, Fong KM, Thunnissen F, Minna JD, Gazdar AF. Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1303–7.
- [39] van Noesel MM, van Bezouw S, Salomons GS, Voute PA, Pieters R, Baylin SB, Herman JG, Versteeg R. Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation. *Cancer Res* 2002;62:2157–61.

### ***III. Résultat complémentaires***

#### ***2.2.4.1.III.1. Caractérisation et Étude de la méthylation de EP 300***

Une fréquence élevée de délétion du chromosome 22 a été décrite dans les épendymomes sans qu'un gène cible spécifique ait été caractérisé. Nous avons, donc, effectué une étude de la méthylation de gènes suppresseurs localisés dans cette région : TIMP3, NF2, INI1 et EP300. Les méthodes permettant d'analyser la méthylation de TIMP3, NF2 et INI1 ont été décrites par Eads (2001), Kino (2001) et Sevenet (1999) et nous les avons appliquées dans notre étude des épendymomes de l'enfant. Par contre ; la méthylation de EP300 n'a jamais été décrite. Nous avons, donc, cherché à voir si ce mécanisme pourrait réguler l'expression de EP300.

EP300 est situé au centre de 22q et code pour une histone acétyltransferase. Il fonctionne aussi comme un co-activateur de la transcription (Bryan, 2002).

Nous avons tout d'abord évalué si le promoteur de ce gène était riche en CpG. Puis, nous avons mis au point un MSP spécifique de cette région en utilisant la méthode suivante.

#### ***2.2.4.1.III.2. Prédiction de promoteur et îlot CpG***

Nous avons cherché le gène EP300 sur genbank. Nous avons, donc, retrouvé la séquence nommée NT\_011520 qui code pour la protéine p300 humaine (locus HSU01877). La séquence génomique qui contient le gène EP300 a donc été évaluée avec l'aide de l'outil PromoterScan (<http://bimas.dcrn.nih.gov/cgi-bin/molbio/proscan>) pour définir la région promotrice.

La région riche en CpG a été déterminée par la présence d'un ADN de 200-bp avec une quantité de CG supérieure à 50% et une relation CpG/GpC supérieure à 0.5 avec l'aide de l'outil <http://cpgislands.usc.be>.

2.2.4.1.III.3. MSP

Une fois la région riche en CpG du promoteur trouvée, nous avons, avec l'aide de METHPRIMER (Li, 2002) sur le site <http://www.urogene.org/methprimer/> caractérisé plusieurs amorces utilisables en MSP. Nous avons choisi des amorces avec au moins trois CGs et avec une température d'hybridation proche pour les amorces sens et antisens. Les amorces choisies pour la PCR sont:

EP 300 U Sens 5'-3' :TTGTTTGTATATATTTTTATTGTGG

EP 300 U Antisens 5'-3' : AACCAATACTAAAACACCCA

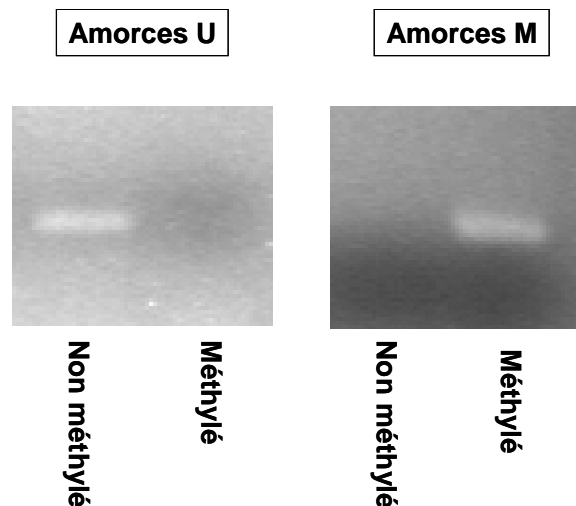
EP 300 M Sens 5'-3' : TCGTTCGTATATATTTTTATCGCG

EP 300 M Antisens 5'-3' : GACCAATACTAAAACGCCCCG

Un produit de 145 pb de taille est obtenu.

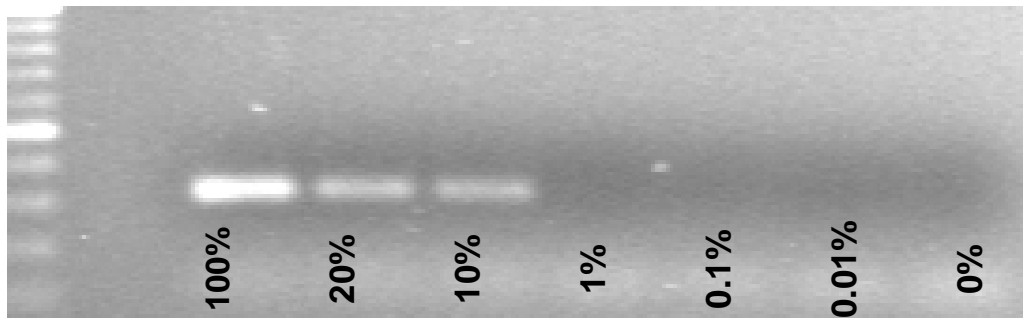
Après plusieurs essais de mise au point, la température d'hybridation utilisée dans l'étude de la méthylation de ce gène a été de 55°C et donnée des bandes nettes sur le gel d'agarose (Figure 22).

**Figure 22. Analyse par MSP de la région promotrice du gène EP300.**



Nous avons ensuite testé la sensibilité de la méthode en réalisant des dilutions d'ADN méthylé dans de l'ADN non méthylé. Nous obtenons une sensibilité de 1/100 (Figure 23).

**Figure 23. Test de la sensibilité de la détection de la méthylation du promoteur EP300 par MSP.**



*% représente le pourcentage d'ADN méthylé in vitro avec la méthylase SSI présent dans l'échantillon analysé.*

#### *2.2.4.1.III.4. Résultats*

Aucune méthylation de ce gène n'a été observée dans les 27 épendymomes intracrâniens et les 7 papillomes du plexus choroïde testés. Nous n'avons pas inclus ces résultats dans les publications car nos résultats négatifs peuvent être dus à un manque de sensibilité de notre technique. En effet, dans la plus grande partie des autres gènes testés la sensibilité de la MSP est de 1/1000 alors que pour EP300 elle n'est que de 1/100. Sinon, la méthylation d'EP300 peut ne pas être le mécanisme d'inactivation de ce gène suppresseur de tumeur. D'autres études restent à réaliser pour tester ces hypothèses.



## **2.4.2. Dysfonction de la voie du p53 dans les épendymomes primitifs des enfants**

### ***I. Présentation du travail et questions posées***

Dans le but de caractériser des facteurs pronostiques dans les épendymomes, nous avons participé à un travail sur le gène p53 et sa voie, initié par l'équipe de l'Institut Gustave Roussy de Villejuif. Récemment, un index de prolifération élevé et l'immunoréactivité de p53 ont été décrits comme des marqueurs pronostiques possibles (Zamecnik, 2003). Il a été observé que ce dysfonctionnement de p53 peut occasionner une radio et une chimiorésistance. Celle-ci peut être engendrée par des mutations, par hyperméthylation de sa région promotrice (Agirre, 2003), aussi bien que par d'autres mécanismes comme la surexpression de MDM2 (Lowe, 1993), la perte ou la méthylation du gène p14ARF (Agirre, 2003), ou la dérégulation de PAX5 (Stuart, 1995). A ce jour, des altérations du gène p53 ont été très rarement décrites dans les épendymomes et peu d'études existent sur MDM2, p14ARF, et PAX5. Le but de cette étude était d'analyser p53 dans les épendymomes de l'enfant au moment du diagnostic et lors de récurrences, et d'évaluer la fonction de p53 dans deux xénogreffes établies à partir d'épendymomes primitifs.

Notre contribution dans cette étude a été l'analyse de la méthylation du gène p53 dans ces tumeurs.

### ***II. Publication n. 2***

p53 Pathway Dysfunction in Primary Childhood Ependymomas

N. Gaspar, J. Grill, B. Georger, A. Lellouch-Tubiana, M.B. Michalowski, G. Vassal.

Pediatric Blood and Cancer 46(5):604-13, 2006.

### **III. Résumé**

Les ependymomes de l'enfant représentent la troisième tumeur intracrânienne chez l'enfant. Elle reste un défi thérapeutique majeur vu que la survie ne s'est pas améliorée dans les dernières décennies (50% des enfants sont en vie 5 ans après le diagnostic) malgré la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. La qualité de l'exérèse est le principal facteur lié au pronostic. Les altérations de p53 peuvent entraîner une résistance aux drogues et à la radiothérapie. Cette voie peut être altérée par des mutations de TP53 ou la méthylation de sa région promotrice. Nous avons donc fait l'hypothèse que la fonction de p53 peut être anormale dans les épendymomes ce qui peut expliquer leur résistance au traitement.

Des épendymomes primitifs ou au moment de la rechute de 24 enfants ont été analysés au niveau de la voie de p53 utilisant un essai fonctionnel, RT-PCR, une analyse de Western blot, et/ou immunohistochimie pour la mutation de TP53, l'étude de la délétion et de l'hyperméthylation du promoteur p14ARF, et de l'expression de MDM2 et de PAX5. La réponse induite par p53 aux lésions de l'ADN entraînées par la radiation a été évaluée par Western blot et analysée par cytométrie de flux dans deux modèles de xenogreffes d'épendymomes: IGREP37 et IGREP83, dérivés des épendymomes primitifs anaplasiques de l'enfant.

Aucune anomalie des gènes TP53, MDM2, p14ARF, PAX5 n'a été observée dans les épendymomes primitifs et dans les xénogreffes testés. Malgré l'absence de ces anomalies, la réponse par arrêt de la croissance liée à p53 en G1 induite par l'irradiation était altérée dans les tumeurs xenogreffées IGREP37. Même si l'irradiation induisait la nécrose et mort cellulaire par apoptose, les tumeurs IGREP37 étaient modérément sensibles à la radiothérapie *in vivo*. Par contre, l'irradiation entraînait un retard significatif dans la croissance tumorale et améliorait la régression tumorale dans les xenogreffes IGREP83 qui présentait une p53 fonctionnelle.

Les altérations de l'arrêt de croissance médiés par p53 pourraient être impliqués dans la radio-résistance des épendymomes.



## p53 Pathway Dysfunction in Primary Childhood Ependymomas

Nathalie Gaspar, MD,<sup>1</sup> Jacques Grill, MD, PhD,<sup>1,2,3</sup> Birgit Geoger, MD,<sup>1,2\*</sup> Arielle Lellouch-Tubiana, MD,<sup>4</sup> Mariana Bohns Michalowski, MD,<sup>5</sup> and Gilles Vassal, MD, PhD<sup>1,2</sup>

**Background.** Childhood ependymoma remains a major therapeutic challenge despite surgery, chemotherapy, and irradiation. We hypothesized that p53 function might be abrogated in ependymomas and implicated in their resistance to anti-cancer therapy. **Procedure.** Primary ependymomas at diagnosis or relapse from 24 children were analyzed for p53 pathway, using a functional assay in yeast, RT-PCR, Western blot analysis, and/or immunohistochemistry for *TP53* mutation, *p14<sup>ARF</sup>* deletion and promoter hypermethylation, *MDM2* and *PAX5* expression, respectively. p53-mediated response to radiation-induced DNA damage was evaluated using Western blot and flow cytometry analysis in two ependymoma xenograft models, IGREP37 and IGREP83, derived from primary anaplastic childhood ependymomas. **Results.** No *TP53*, *MDM2*, *p14<sup>ARF</sup>*, *PAX5* gene

abnormalities were detected in the primary ependymomas tumors and xenografts tested. Interestingly, despite the lack of these abnormalities, p53 induced p21-mediated G<sub>1</sub> growth arrest in response to irradiation was altered in the IGREP37 xenograft tumors. Although irradiation induced necrosis and apoptotic cell death, IGREP37 tumors were moderately sensitive to radiation therapy in vivo. In contrast, irradiation yielded significant tumor growth delays and tumor regressions in the p53 functional IGREP83 xenografts. **Conclusion.** Alterations in p53-mediated growth arrest in ependymomas might be implicated in the radio-resistance of these tumors and demand further evaluation. *Pediatr Blood Cancer* 2006;46:604–613. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** ependymoma; MDM2; PAX5; p14<sup>ARF</sup>; p53 pathway; xenograft models

### INTRODUCTION

Intracranial ependymoma represents the third most frequent primary brain tumor in childhood and remains difficult to treat. Despite a multimodal therapeutic approach, outcome did not improve significantly in the last decades with less than 50% of children surviving within 5 years [1]. The extent of surgical resection remains the only factor consistently associated with prognosis [2]. More recently, high proliferation index and p53 immunostaining have been described as biological marker of prognosis [3]. Moreover, one of the intriguing characteristics of these tumors is their resistance to current anti-cancer agents [1]. Radiation therapy remains the most effective adjuvant treatment after surgery [4].

p53 dysfunction may lead to drug and radio-resistance [5]. This pathway can be altered by mutations of the *TP53* suppressor gene or hypermethylation of its promoter region [6], as well as by other mechanisms, such as *MDM2* overexpression, loss or methylation of the *p14<sup>ARF</sup>* gene, or *PAX5* deregulation [5,7]. To date, *TP53* gene alterations have been rarely reported in ependymomas, and few or no studies exist on *MDM2*, *p14<sup>ARF</sup>*, and *PAX5*. The aim of this study was to analyze p53 in primary childhood ependymomas at diagnosis and at relapse as well as evaluate p53 function in two newly described xenograft models established from primary ependymomas.

### MATERIALS AND METHODS

#### Patients and Material

Twenty-eight primary tumor samples were obtained from 24 children (10 males) with a median age of 30 months (range: 7–131 months). Twenty-seven tumors were located

in the posterior fossa, one was a supratentorial ependymoma (No. 13). Twenty-two samples were obtained at diagnosis, five at time of first relapse, and one at second relapse. Tumor material at diagnosis and at relapse was obtained in three children. All patients but one received adjuvant treatment after surgery: children younger than 3 years were treated with chemotherapy (n = 11), those older than 3 with local irradiation (n = 4), one received chemotherapy followed by irradiation. Adjuvant treatment was unknown for eight children. Tumors were classified according the WHO grading system and classification [8]: 16 were anaplastic and 8 were low-grade ependymomas.

#### Animals

Female athymic Swiss mice aged 6–8 weeks were bred locally and housed in sterile conditions. Experiments

Abbreviations: CGH, comparative genomic hybridization; FACS, fluorescence-activated cell sorter; FASAY, functional assay of separated alleles in yeast; RT-PCR, reverse transcribed polymerase chain reaction.

<sup>1</sup>Pharmacology and New Treatments in Cancer UPRES EA 3535, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; <sup>3</sup>Genetic Oncology (UMR 1599), Villejuif, France; <sup>4</sup>Department of Pathology, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France; <sup>5</sup>UF Cancerology, Biology and Biotherapy, CHU La Tronche, Grenoble, France

Grant sponsor: La Ligue Contre le Cancer; Grant sponsor: Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

\*Correspondence to: Birgit Geoger, Department of Pediatrics, Pharmacology and New Treatments in Cancer UPRES EA 3535, Institut Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif cedex, France. E-mail: geoger@igr.fr

Received 30 March 2005; Accepted 9 June 2005

were carried out under the conditions established by the European Union (directive no.86-609 CEE) and in accordance with the UKCCCR guidelines [9].

### Establishment of Xenografts

Samples of primary ependymomas from neurosurgical resection procedure were placed in RPMI culture medium (Gibco, Invitrogen SARL, Clergy Pontoise, France), supplemented with antibiotics, at 4°C, and processed within 1 hr. Thirteen tumor specimens were transplanted subcutaneously, five intracranially, and one at both sites in athymic mice after 5 Gy total body irradiation. Depending on the available tumor size, 1–10 (median 5) mice received a transplant per tumor. Tumor fragments of 3 × 3 mm were transplanted subcutaneously, as described previously [10]. For intracranial transplantation, fragments were mechanically dissociated in RPMI medium and cells resuspended after centrifugation in culture medium.  $5 \times 10^4$ – $1 \times 10^5$  cells were injected in the right cerebral hemisphere of anesthetized mice using a Hamilton syringe. Animals were observed until occurrence of a measurable subcutaneous tumor or neurological deterioration or followed up to 1 year if no tumor occurred. After successful tumor take, xenografts were maintained in vivo by consecutive subcutaneous transplantation. The human origin of the xenografts was confirmed by the analysis of lactate dehydrogenase isoenzymes at regular time-points. The growth pattern was characterized for each xenograft according to its latency, defined as the time to reach 200 mm<sup>3</sup>, and its doubling time during the phase of exponential growth, defined as the time elapsed between tumor volumes of 200–400 mm<sup>3</sup>. Histological analysis was done at the first and at various passages thereafter.

### Experimental Design and Irradiation

Antitumor activity of irradiation was evaluated against IGREP37 and IGREP83 at an advanced tumor stage, as described previously [10]. Briefly, xenograft fragments were transplanted subcutaneously in female athymic nude mice. Eight to ten animals bearing a 100–300 mm<sup>3</sup> tumor received 5 Gy total body irradiation once. X-rays was delivered under a tension of 225 kV and 17mA, using a filter of 0.5 mm CU with an RT250 Phillips. Control animals were closed in the isolation system without being irradiated. Tumor volumes and body weight were evaluated twice a week. Experiments were stopped when the median tumor volume reached 1,500 mm<sup>3</sup>. The therapeutic activity was evaluated according to number of complete (CR) and partial tumor regression (PR) at two consecutive measurements, and tumor growth delay (TGD). Statistical significance between treatment groups and controls in their time to reach five times initial tumor volume was estimated by two-tailed non-parametric Mann–Whitney test.

### Genotyping of *TP53*

Genomic DNA of tumors was amplified as three fragments including, respectively exons 2–4, 5–8, and 9–11. Genotyping was subsequently carried out with a functional assay in yeast (FASAY) as described previously [11,12]. Pfu DNA polymerase (Stratagene) was used to amplify *TP53* reverse transcripts before transcription in yeast. Yeast colonies carrying a *TP53* mutant allele were identified as red colonies. A percentage of red colonies >5% was considered as indicative of a mutation and red colonies were then sequenced. The malignant glioma xenograft IGRG88, which exhibits a mutation in exon 4, with a T to A transition at codon 113, was used as positive control [12]. *TP53* cDNA was extracted from mutant colonies and sequenced.

### Western Blot Assay

IGREP37 and IGREP83 tumor xenografts were harvested at baseline and 4, 8, 24, 48, 72 hr, and 7 days after 5 Gy TBI irradiation and were frozen at –80°C. Protein lysates were separated electrophoretically in 7.5%–12% SDS–PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond P, Amersham Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) as described before [13]. Detection in immunoblotting was performed using mouse anti-human DO-7 (DAKO A/S, Glostrup, DK) diluted 1:500, anti-human p21/WAF-1 (Ab-1) (Oncogene Science, Cambridge, MA) diluted 1:500, anti-MDM2 (Ab-1) (Oncogene Science, Cambridge, MA) diluted 1:100, anti-PAX5 (BD Biosciences, Pharmingen, France) diluted 1:250, anti-β-Actin (AC-15) (Sigma-Aldrich, France) diluted 1:1,000. Blots were revealed with rabbit anti-mouse secondary antibody followed by ECL solution (Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

Northern blot analysis for mRNA *MDM2* expression and gene copy dosage by real-time quantitative PCR for *p14<sup>ARF</sup>* gene deletions were performed as described previously [12].

### Analysis of Gene Promoter Methylation

Bisulfite modification of genomic DNA was performed as described by Hermann et al. [14]. Methylation specific PCR determined methylation at the CpG island promoter regions of the *p14<sup>ARF</sup>* and the *TP53* genes, and the CCWGG motifs of the *TP53* promoter, as described previously in Reference [6,15], respectively. DNA from normal leukocytes was used as negative control, DNA from leukocytes subjected to bisulfite treatment with Sss1 methyltransferase was used as a positive control. Samples giving signals equivalent to the positive controls were designated as methylated.

### PAX5 mRNA Expression

*PAX5* mRNA expression was detected using RT-PCR as described by Kozmik [16], and/or using the Taqman

quantitative RT-PCR technique. *PAX5* expression levels were compared to medulloblastoma xenografts, the lymphoma cell line Raji, and normal brain tissue from a temporal lobectomy in a child with epilepsy. Sample cDNA was synthesized by the conversion of 1 µg of total RNA using the SuperScript II kit (Invitrogen) and random primers (Applied Biosystem), according to the manufacturer's recommendations. The PCR mixture consisted of 12.5 µl of Taqman Universal MasterMix with UNG (Applied Biosystems, CA), 1.25 µl of a solution containing forward and reverse primer, and probe of *PAX5* (purchased by APPLIED Assay on demand products), cDNA diluted at 1/20, and H<sub>2</sub>O up to a total volume of 20 µl. To standardize the quantitation of *PAX5* genes, 18S from each sample was quantified on the same plate with the target genes by using TaqMan 18S Control Reagents kit (VIC dye-labeled; Applied Biosystems); samples were processed in triplicates. A standard curve was generated in each experiment by cDNA from a medulloblastoma xenograft known not to overexpress *PAX5*. Ratio of 2-DDCts to this standard sample represented the relative expression level of *PAX5* mRNA.

### Karyotyping and Comparative Genomic Hybridation (CGH)

Twenty mitoses were analyzed in mechanically from fresh xenograft tumors dissociated cells. CGH was performed with DNA extracted from frozen xenograft tumor fragments, as described previously [17].

### Flow Cytometry for Cell Cycle

IGREP37 and IGREP83 tumors were harvested at baseline and 4, 8, 24, 48, 72 hr, and 7 days after 5 Gy TBI irradiation and were frozen at -80°C. Tumor cells were aspirated with a 20G needle from frozen tumors, resuspended in Tris buffer and stained with propidium iodide [12]. DNA content of individual cells was measured using a FACScalib and analyzed with the Cell Quest program (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium).

### Histology

Five-micrometer sections of acetic-acid-formalin- ethanol-fixed, paraffin-embedded tumors were stained with hematoxylin-eosin-safranin (HES) for morphology.

### Immunohistochemistry

The DO7 antibody for p53, 1:50, and the anti-PAX-5 antibody, 1:30, were revealed after microwave treatment in Clean Vision™ Antigen Retrieval Solution (pH 9.0 and 6.0, respectively, Microm Microtech France, Francheville, France) by HistoMouse™ Max Kit and diaminobenzidine (Zymed, San Francisco, CA). Slides were counterstained with hematoxylin.

## RESULTS

### p53 Pathway Analysis in Primary Ependymomas

Out of 28 primary ependymomas from 24 children, frozen material for genetic studies of *TP53* was available in 13 samples in 11 patients: 10 at diagnosis and 3 at relapse. In two patients (No. 3 and 7), tumor material was evaluated at diagnosis and at relapse. p53 pathway analysis in these tumors is summarized in Table I. FASAY determined in none of these ependymomas a *TP53* gene mutation. The percentage of red colonies (indicative of *TP53* mutations) was below 5%, in contrast to 100% red colonies in the *TP53* mutant control tumor, and sequencing of the DNA extracted from some of the red colonies showed no mutations. No hypermethylation of the CpG dinucleotides and CCWGG motifs of the *TP53* promoter region was found in six ependymomas at diagnosis and two at relapse. Western blot analysis showed low levels of p53 expression in six samples tested. Thus, *TP53* gene alterations were not detected in our series of ependymomas at diagnosis as at relapse.

We further evaluated if other factors might have abrogated p53 function in these ependymomas. MDM2 was not overexpressed in six primary tumors analyzed by Western blot. Neither deletion of *p14<sup>ARF</sup>* gene was found in five tumors examined, including one at relapse, as detected by gene copy dosage carried out by RT-PCR, nor *p14<sup>ARF</sup>* promoter hypermethylation was detected in 13 tumors, including 4 at relapse. RT-PCR and semi-quantitative real-time PCR Taq-man technique detected *PAX5* mRNA in 13 of 18 tumor samples at diagnosis and 4 of 5 at relapse. However, *PAX5* mRNA expression level in ependymomas ranged from 1–45.3 2-DDCt (median 3.1) and was thus 2–4 log lower than those observed in medulloblastomas (357.8–2 164.8 2-DDCt; median 767.1) and the Raji B-lymphoma cell line tested (10,660.6 2-DDCt), respectively (Table I). *PAX5* protein expression was further evaluated in 16 primary ependymomas using immunohistochemistry. In two ependymomas, 5% tumor cells expressed *PAX5*. All tumor samples showed infiltrations of B-lymphocytes, expressing strongly *PAX5*.

### Tumorigenicity of Ependymomas and Establishment of Xenografts

Sixteen ependymoma tumors at diagnosis and three at relapse were transplanted subcutaneously or intracranially in athymic mice. For two patients (No. 7 and No. 12), tumors were transplanted at time of diagnosis and at relapse. Eleven tumor specimens showed anaplastic features, eight were classified as low grade. Three tumors transplanted subcutaneously were tumorigenic (16%; 95% Confidence Interval, 7%–24%) (Table II). The median latency time was 229 days (range 112–350) and the tumor doubling time of the first passages ranged from 21–53 days.

TABLE I. p53 Pathway in Primary Childhood Ependymoma

No	FASAY % red colonies	p53 WB	TP53 Promoter hypermethylation		MDM2 WB	<i>p14<sup>ARF</sup></i> gene RT-PCR	<i>p14<sup>ARF</sup></i> Promoter methylation <sup>c</sup>	<i>PAX5<sup>f</sup></i> RT-PCR/Taq man	<i>PAX5<sup>g</sup></i> IHC
			CpG <sup>d</sup>	CCWGG <sup>d</sup>					
1	2	+	ND	ND	+	ND	ND	Detected	ND
2	3	–	ND	ND	–	No deletion	–	–	ND
3	5	–	–	–	–	ND	–	–	ND
3R <sup>a</sup>	3	ND <sup>c</sup>	–	–	ND	No deletion	–	Detected	–
4	2	ND	–	–	ND	ND	–	–	ND
7	6	–	–	–	–	No deletion	–	Detected	–
7R	4.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	–	–
9	4	+	ND	ND	–	ND	–	–	–
12R	16 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	–	Detected	–
14	1	ND	–	–	ND	No deletion	–	Detected	–
16	2	ND	ND	ND	ND	No deletion	ND	Detected	–
17	1	+	ND	ND	+	ND	ND	–	–
18	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Detected	–

<sup>a</sup>Relapse.

<sup>b</sup>Artefact = 3 red colonies tested without p53 mutation.

<sup>c</sup>Not done.

<sup>d</sup>Eight samples were evaluated for *TP53* promoter methylation; those evaluated also for p53 were presented in the table. None presented hypermethylation of the CpG island and the CCWGG motifs.

<sup>e</sup>Thirteen samples were evaluated for *p14<sup>ARF</sup>* promoter methylation; those evaluated also for p53 were presented in the table. None presented hypermethylation of *p14<sup>ARF</sup>* promoter gene.

<sup>f</sup>Twenty-three samples were evaluated for *PAX5* expression; those evaluated also for *TP53* were presented in the table. Ependymoma samples ranged between 1–45.25, with a median of 3.1. *PAX-5* overexpressing medulloblastoma xenografts were between 357–2,165 and the Raji cell line at 10,660.

<sup>g</sup>Sixteen samples were evaluated for *PAX5*; those evaluated also for *TP53* were presented in the table. 2/16 expressed *PAX5* in 5% of tumor cells.

Two xenografts (IGREP37 and IGREP83) were successfully passaged in vivo beyond the third passage and their doubling time decreased and stabilized at 12–22 days after more than five passages. Currently, after 10 years of in vivo passages, the tumor take rate at each passage was similar in both xenografts (95%) but occurred faster in IGREP37 than in IGREP83. Both xenografts exhibited at early in vivo passages the classical histological features of ependymoma with a high cellular density punctuated by the distinctive Homer–Wright perivascular pseudorosettes and ependymal tubular rosettes (Fig. 1). With successive passages, the xenografts showed anaplastic features with a proliferation of dense poorly differentiated tumor cells, with irregular nuclei, coarse chromatin, and brisk mitotic activity, an apparition of necrosis foci, and only rarely differentiation features such as Homer–Wright rosettes. Interestingly, between passages 14 and 28, a central metaplastic cartilage was noted in an otherwise typical anaplastic IGREP37 tumor. Karyotyping of IGREP83 and CGH of IGREP37 showed 45 chromosomes with XX and a loss of chromosome 22 in both xenografts. Chromosome 22 loss had not been found in the patient's tumor, of which derived the xenograft IGREP37, however, in the relapsing tumor of this patient. The IGREP95 xenograft exhibited prolonged tumor stabilization and benign histolo-

gical features after the second passage and did not grow further (data not shown).

### p53 Function in Human Ependymoma Xenografts

To extend the findings in primary ependymomas, we evaluated additionally the p53 response to DNA damage in IGREP37 and IGREP83 xenograft tumors (Table III). Consistent with the primary ependymomas, none of the xenograft tumors exhibited a *TP53* mutation, neither initially nor with prolonged in vivo passages, *p14<sup>ARF</sup>* gene deletion or promoter hypermethylation, nor MDM2 overexpression. *PAX5* was not expressed in both xenografts. Immunohistochemistry did not show nuclear expression of p53 within IGREP37 and IGREP83 tumor cells, however, p53 was expressed at 53 kD at higher level in IGREP37 than in IGREP83, in Western blot analysis. Irradiation resulted in stabilization of p53 in IGREP83 tumor cells and induced expression of p21 and MDM2 with a maximum at 4–8 hr and a decrease at 24 hr (Fig. 2A), which is consistent with functional p53 pathway. Cell-cycle analysis showed cell-cycle arrest in G<sub>1</sub> up to 72 hr (90%, 88%, 90%, 96%, and 97% at 0, 8, 24, 48, and 72 hr after irradiation, respectively). Histological analysis of tumors showed post-therapeutic

TABLE II. Tumorigenicity in Athymic Mice and Clinical Outcome of Primary Ependymomas

No	Sex	Age	Treatment	Clinical outcome			Tumorigenicity in mice	
				PFS <sup>e</sup>	OS <sup>f</sup>	Status	s.c.	i.c.
1	M	3.0 years	RT <sup>b</sup>	13y	13y	ADF <sup>g</sup>	0/6	
2	M	5.2 years	CT <sup>c</sup> + RT	9y	9y	ADF	0/10	
3	F	2.5 years	CT	1y	6y	DOD <sup>h</sup>	1/10	
IGREP37								
4	M	1.0 year	CT	1y	4y	DOD	0/9	
5	F	1.4 years	CT	1y	8.5y	DOD	0/7	
6	F	1.4 years	CT	2y	5y	DOD	0/3	
7	M	2.1 years	CT	1y	4y	DOD	0/4	
7R <sup>a</sup>							0/5	
8	F	1.2 years	CT	1.5y	1.5y	DOD	0/4	
10R	F	1.4 years	NA <sup>d</sup>	0.5y	9y	ADF	0/1	
11	M	6.8 years	NA				0/2	
12	F	6.1 years	RT	1y	3y	DOD	3/5	
IGREP83								
12R								0/5
13	F	3.9 years	NA	LF	LF	LF <sup>i</sup>	0/5	
14	M	1.8 years	NA	>1y	LF	LF	1/4	
IGREP95								
15	F	8.2 years	NA	LF	LF	LF		0/2
16	M	2.5 years	CT	3y	7y	ADF		0/2
17	M	1.6 years	NA	1y	6y	ADF		0/3
18	F	2.2 years	CT	6.5y	6.5y	ADF		0/4

<sup>a</sup>Relapse; <sup>b</sup>Radiotherapy; <sup>c</sup>Chemotherapy; <sup>d</sup>Not available; <sup>e</sup>Progression free survival; <sup>f</sup>Overall survival; <sup>g</sup>Alive disease-free; <sup>h</sup>Dead of disease; <sup>i</sup>Lost to follow-up.

changes with altered, dying tumor cells, and their replacement by fibrosis (Fig. 2B). In contrast, p53 and MDM2 expression levels determined by Western blot analysis were reduced after irradiation in the IGREP37 tumors (Fig. 2A), possibly due to the lack of p53 stabilization. p21 was not induced and tumor cells did not arrest in G<sub>1</sub> (86%, 65%, 59%, 68%, and 61% at 0, 8, 24, 48, and 72 hr after irradiation, respectively). These findings suggest an abrogation of the p53 dependent p21-mediated growth arrest pathway in the IGREP37 tumor xenograft. Nevertheless, histological analysis of IGREP37 tumors showed necrotic and apoptotic cell death, besides areas of viable tumor cells (Fig. 2B). The central area of chondroid metaplasia appeared without morphological changes up to 7 days after radiation.

### Anti-Tumor Activity of Irradiation in Ependymoma Xenografts

We evaluated the anti-tumor activity of radiation therapy on both xenograft models using 5 Gy total body irradiation (Fig. 3). Median time to reach five times initial tumor volume was 46 days in IGREP83 control tumor xenografts. IGREP83 tumors were highly sensitive with a significant TGD of 63.1

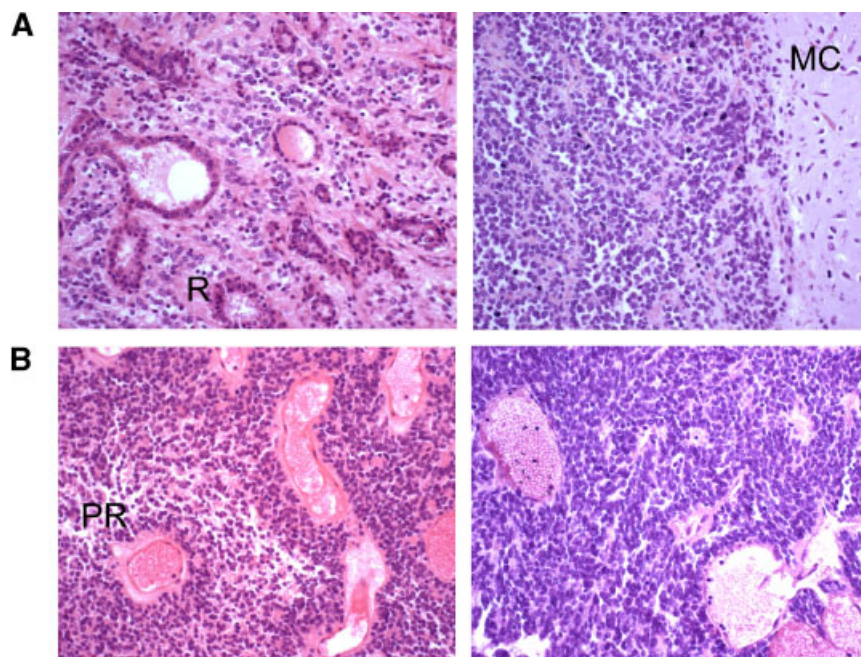
days compared to controls ( $P < 0.001$ ). Five out of eight animals experienced complete tumor regression and three had partial regression. Nevertheless, all IGREP83 tumors started to regrow with a median delay of 28 days (range 28–49) and no animal survived tumor-free as of 120 days. IGREP37 tumors reached a five times initial tumor volume at a median of 29 days. In contrast to IGREP83, irradiation of IGREP37 tumors yielded significant TGD of 13.6 days compared to controls ( $P < 0.001$ ) but no tumor regression.

### DISCUSSION

p53 dysfunction has not yet been well elucidated in ependymoma, although it is a key-event in the carcinogenesis in many human tumors. We studied the p53 pathway in primary intracranial childhood ependymomas at diagnosis and at relapse, and p53-mediated response to DNA-damage in two newly described ependymoma xenograft models.

Using the FASAY technique, we confirmed the absence of *TP53* gene mutations in primary childhood intracranial ependymomas at diagnosis as reported in previous studies using the less sensitive single strand conformational polymorphism (SSCP) technique [18,19] and extended this





**Fig. 1.** Histology of the ependymoma xenografts, IGREP37 (**A**) and IGREP83 (**B**) tumors presented at early passages (left panels) with perivascular pseudorosettes (PR) and ependymal tubular rosettes (R) within dense poorly differentiated tumor cells. With successive passages (right panels), tumors exhibited an increase of anaplastic features with irregular nuclei, irregularly dispersed and coarse chromatin, increased mitotic rate, and foci of necrosis. Metaplastic cartilage (MC). (Original magnification 200 $\times$ ). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

finding to relapsing tumors. Moreover, these results extend those of Nozaki et al. [20], who did not find *TP53* mutations in adulthood spinal ependymoma using the FASAY technique. Hypermethylation of CpG islands within the *TP53* promoter was not found in our samples, consistent with the data shown by Alonso et al. [21]. In addition, we did not find hypermethylated CCWGG motifs within the *TP53* promoter,

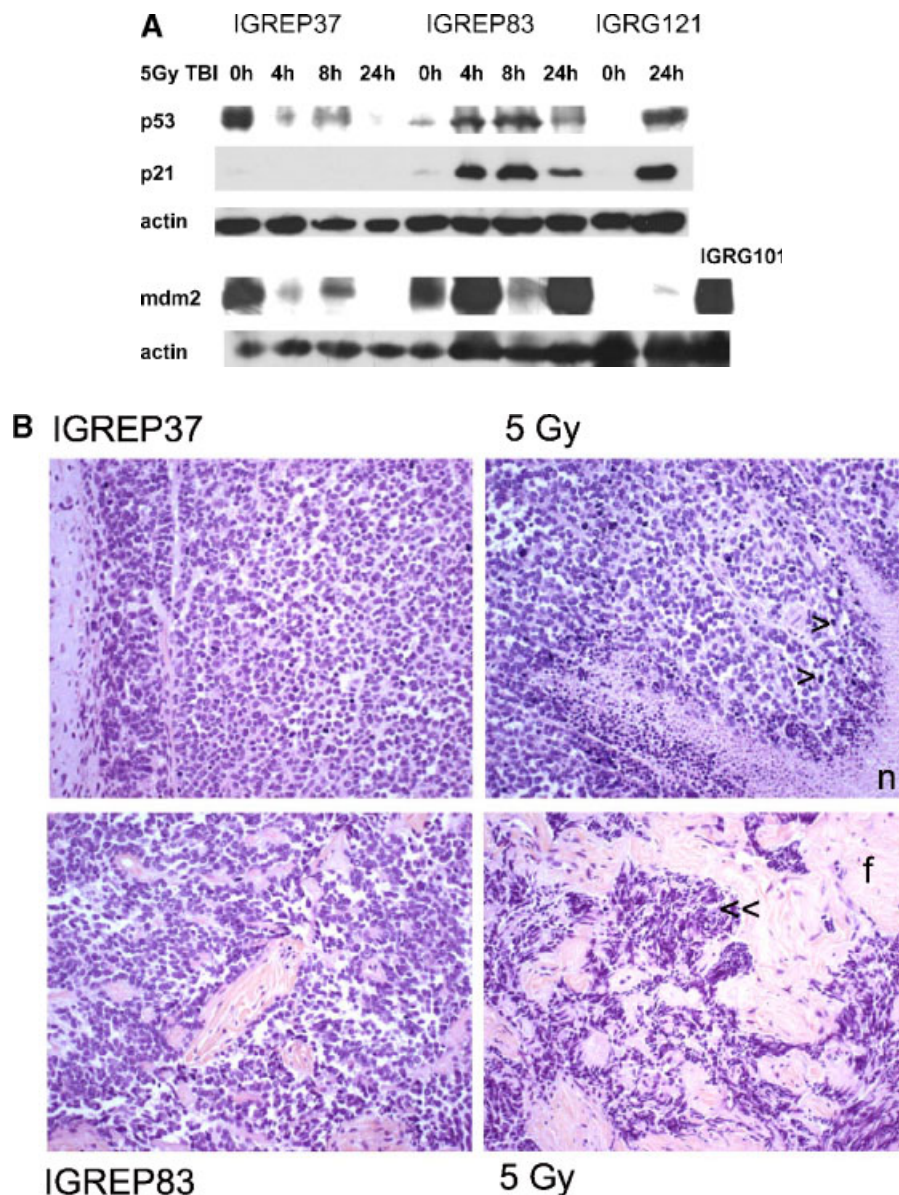
recently described to be associated with decreased *TP53* gene expression in acute lymphoblastic leukemia [6]. Thus, our findings do not suggest a role of *TP53* genetic/epigenetic alterations in the tumorigenesis or progression of childhood ependymomas.

Similarly, *MDM2* overexpression through *MDM2* gene amplification, *p14<sup>ARF</sup>* gene deletion or promoter hyper-

**TABLE III.** Characteristics of and p53 Function in IGREP37 and IGREP83

	IGREP37	IGREP83	IGREP95
Date of establishment	1993	1994	1994
Histology	Anaplastic ependymoma, Chondroid metaplasia	Anaplastic ependymoma	Ependymoma
In vivo doubling time	12 days	22 days	No further growth after the 2nd passage
Cytogenetic analysis	LOH22 (karyotype)	LOH22 (CGH)	ND <sup>a</sup>
Biological analysis			
<i>TP53</i> mutation (FASAY)	Wild-type (8%)	Wild-type (3%)	Wild-type (1%)
p53 protein (WB <sup>b</sup> /IHC <sup>c</sup> )	++/-	+/-	++/-
<i>TP53</i> CpG and CCWGG promoter hypermethylation	No	No	ND
<i>MDM2</i> protein (WB)	+	+	+
<i>MDM2</i> mRNA (NB <sup>d</sup> )	No overexpression	No overexpression	No overexpression
<i>p14<sup>ARF</sup></i> gene (Taq man)	No deletion	No deletion	ND
<i>p14<sup>ARF</sup></i> promoter hypermethylation	No	No	ND
<i>PAX5</i> mRNA (NB/Taq man)	-	-	-
<i>PAX5</i> protein (WB/IHC)	-/-	-/-	ND

<sup>a</sup>Not determined; <sup>b</sup>Western blot analysis; <sup>c</sup>Immunohistochemistry; <sup>d</sup>Northern blot analysis.

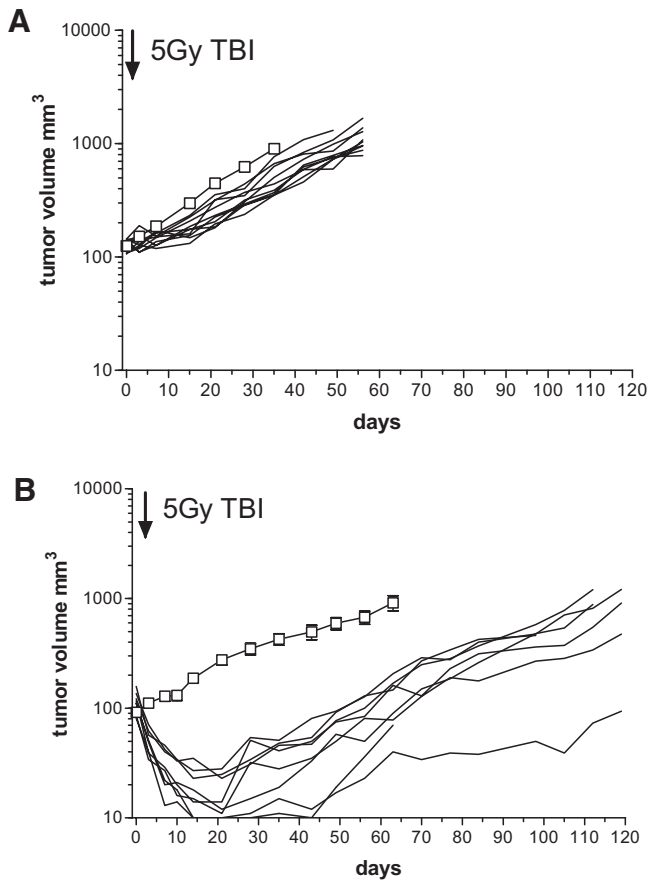


**Fig. 2.** A: p53 function after irradiation of human ependymoma xenografts in vivo, IGREP37 and IGREP83 xenografts were irradiated and harvested at time points indicated. Lysates were separated in SDS-gel, transferred to nitrocellulose membrane and immunostained with mouse anti-human p53, p21/WAF-1, and MDM2, respectively. The human glioma xenograft IGRG121 with a functional p53 served as positive control for p53 and p21 induction, the *MDM2* gene amplified IGRG101 as control for MDM2,  $\beta$ -actin as loading control. B: Morphological changes of IGREP37 and IGREP83 after irradiation, Hematoxylin-eosin-safranin staining 48 hr after irradiation (right panels) revealed the induction of necrosis (n) and apoptotic cell death (>) in IGREP37 tumors besides persistent viable tumor cells, while IGREP83 tumors exhibited intense alterations of remaining tumor cells (<<) and their replacement by fibrosis. Original magnification 200 $\times$ . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

methylation were excluded in our series, though in limited number of samples. This was consistent with recent reports on the low incidence of *MDM2* gene amplification in childhood ependymoma compared to those in adults where *MDM2* gene amplification can reach 50% of the cases [22,23], as well as the rare loss (about 5%) of chromosome 9p which carries the *p14<sup>ARF</sup>* gene [17,24–28]. Nevertheless, Korshunov et al. [29] suggested that decreased p14<sup>ARF</sup>

immunostaining was associated with increased ependymoma grade and others found *p14<sup>ARF</sup>* promoter hypermethylation to be implicated in ependymoma, though less frequently in children than in adults [21,30].

p53 gene expression may be downregulated at a transcriptional level by the binding of various *PAX* gene products [7]. In our series, *PAX5* mRNA expression was detectable in most of the samples, however at low level,



**Fig. 3.** Anti-tumor activity of irradiation in s.c. human ependymoma xenograft, mice bearing IGREP37 (A) and IGREP83 (B) xenograft tumors were irradiated with 5 Gy at an advanced tumor stage. Irradiation of IGREP37 tumors yielded in tumor growth delay of 13.6 days compared to untreated controls ( $P < 0.001$ ). IGREP83 was highly sensitive with five complete and three partial tumor regressions out of eight animals and a significant tumor growth delay of 63.1 days ( $P < 0.001$ ) as compared to controls. Control animals were presented as means; bars represent standard error of mean. Each irradiated animal is shown as a single line.

PAX5 protein was present only rarely and in few tumor cells. All tumors exhibited infiltrations of B-lymphocytes expressing PAX5, which may be responsible for the low expression of PAX5. Unlike in other pediatric brain tumors such as medulloblastomas [16,31], we could not implicate PAX5 in the oncogenesis of childhood ependymoma.

The newly described xenograft models allowed us to study in vivo p53 function in response to DNA damage, such as irradiation, which remains the main treatment for childhood ependymoma in addition to surgical resection. Despite the lack of *TP53* mutations, *p14<sup>ARF</sup>* alteration, *MDM2* amplification, or *PAX5* expression, as shown in the primary ependymomas, IGREP37 tumor cells exhibited an abrogated p53-mediated cell growth arrest. This might at least in part be responsible for the relative radio-resistance of this tumor. In contrast, the p53 wild-type IGREP83 tumors revealed an

important response to irradiation. Thus, the main mechanisms known to impair p53 function in cancers could be excluded in this series of primary childhood ependymomas, but further investigations are necessary to elucidate p53 alteration, as observed in our ependymoma xenograft.

Experimental models are helpful to understand carcinogenesis and to develop new therapeutics for cancer. Compared with other malignant brain tumors, ependymoma displayed low tumorigenicity in mice, and human cell lines [32,33] and xenografts remain exceedingly rare [34–36]. Here we described two new relevant xenograft models derived from primary pediatric anaplastic ependymomas. Using the same engraftment techniques as for glioblastoma [37] and medulloblastoma [10], we found for ependymomas a far lower rate of growth and ability to propagate as well as a prolonged time until tumor started to grow. This phenomenon may be related to the slow growth of ependymoma in children. Unlike in medulloblastoma [10], we could not correlate tumorigenicity with an aggressive behavior of the tumor in patients due to the small number of xenografts obtained.

All three xenografts presented with classical histological features of ependymomas, such as ependymal differentiation, high cellular density, and perivascular pseudorosettes. Successive in vivo passages of IGREP37 and IGREP83 were associated with increased growth velocity and loss of differentiation. The IGREP95 xenograft exhibited well differentiated benign features and was not further tumorigenic, suggesting that tumorigenicity of ependymoma in athymic mice may be linked to the degree of differentiation, as shown for other tumor types [38,39]. In addition, sequential in vivo passages may select aggressive and anaplastic cells within the tumor. Interestingly, the IGREP37 xenograft developed chondroid metaplasia. This attribute is reported in multiple cancers and represent a rare event of malignancies, including ependymoma [40]. Compared to other malignant brain tumors, prolonged tumor doubling times of both xenograft lines stand in good agreement with the clinical behavior of these neoplasms in children and was comparable to those of other ependymoma xenografts described [34,35]. IGREP37 and IGREP83 presented with monosomy 22, which has been reported in 30% primary ependymomas [41]. McLendon described two xenografts with diploid karyotypes, complex anomalies, and a deletion of chromosome 6 in one, but no loss of chromosome 22 [34].

In conclusion, we demonstrated that the p53 pathway in ependymoma can be circumvented without *TP53* gene mutation or promoter hypermethylation, *MDM2* overexpression, *p14<sup>ARF</sup>* deletion or promoter hypermethylation or increased PAX5 expression, and needs further investigation. In addition, we describe two new ependymoma xenograft models, which represent potentially valuable models for studies on oncogenesis and therapeutic approaches in ependymomas with aggressive behavior.

## ACKNOWLEDGMENT

We thank Paule Opolon, Vectorology and Gene Transfer (UMR 8121), Institut Gustave Roussy, Villejuif, for histological analysis and immunohistochemistry; Marie-José Terrier-Lacombe, Department of Pathology, for morphology analysis, Michel Barrois; Genetic Unit, for p14 PCR; Yann Lecluse for flow cytometry analysis; Hervé Avet-Loiseau, Laboratory of Cytogenetics, University Medical Center, Nantes, for cytogenetics analysis; and Thierry Frebourg, Inserm EPI 9906, Faculty of Medicine and Pharmacy, Rouen, for sharing information on p53 functional assay.

## REFERENCES

- Grill J, Pascal C, Chantal K. Childhood ependymoma: A systematic review of treatment options and strategies. *Paediatr Drugs* 2003;5: 533–543.
- Bouffet E, Perilongo G, Canete A, et al. Intracranial ependymomas in children: A critical review of prognostic factors and a plea for cooperation. *Med Pediatr Oncol* 1998;30:319–329; discussion 329–331.
- Zamecnik J, Snuderl M, Eckschlagler T, et al. Pediatric intracranial ependymomas: Prognostic relevance of histological, immunohistochemical, and flow cytometric factors. *Mod Pathol* 2003;16: 980–991.
- Merchant TE, Mulhern RK, Krasin MJ, et al. Preliminary results from a phase ii trial of conformal radiation therapy and evaluation of radiation-related CNS effects for pediatric patients with localized ependymoma. *J Clin Oncol* 2004;22:3156–3162.
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, et al. P53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993;74: 957–967.
- Agirre X, Vizmanos JL, Calasanz MJ, et al. Methylation of CpG dinucleotides and/or CCWGG motifs at the promoter of TP53 correlates with decreased gene expression in a subset of acute lymphoblastic leukemia patients. *Oncogene* 2003;22:1070–1072.
- Stuart ET, Haffner R, Oren M, et al. Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression. *EMBO J* 1995;14:5638–5645.
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, et al. The who classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:215–225; discussion 226–219.
- Workman P, Twentyman P, Balkwill F, et al. United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) Guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia (second edition). *Br J Cancer* 1998;77:1–10.
- Vassal G, Terrier-Lacombe MJ, Lellouch-Tubiana A, et al. Tumorigenicity of cerebellar primitive neuro-ectodermal tumors in athymic mice correlates with poor prognosis in children. *Int J Cancer* 1996;69:146–151.
- Flaman JM, Frebourg T, Moreau V, et al. A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3963–3967.
- Geoerger B, Grill J, Opolon P, et al. Oncolytic activity of the E1B-55 kDa-deleted adenovirus Onyx-015 is independent of cellular p53 status in human malignant glioma xenografts. *Cancer Res* 2002;62:764–772.
- Geoerger B, Grill J, Opolon P, et al. Potentiation of radiation therapy by the oncolytic adenovirus dl1520 (Onyx-015) in human malignant glioma xenografts. *Br J Cancer* 2003;89:577–584.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821–9826.
- Zochbauer-Muller S, Fong KM, Virmani AK, et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2001;61:249–255.
- Kozmik Z, Sure U, Ruedi D, et al. Deregulated expression of PAX5 in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5709–5713.
- Grill J, Avet-Loiseau H, Lellouch-Tubiana A, et al. Comparative genomic hybridization detects specific cytogenetic abnormalities in pediatric ependymomas and choroid plexus papillomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;136:121–125.
- Ohgaki H, Eibl RH, Schwab M, et al. Mutations of the p53 tumor suppressor gene in neoplasms of the human nervous system. *Mol Carcinog* 1993;8:74–80.
- Fink KL, Rushing EJ, Schold SC Jr., et al. Infrequency of p53 gene mutations in ependymomas. *J Neurooncol* 1996;27:111–115.
- Nozaki M, Tada M, Matsumoto R, et al. Rare occurrence of inactivating p53 gene mutations in primary non-astrocytic tumors of the central nervous system: Reappraisal by yeast functional assay. *Acta Neuropathol (Berl)* 1998;95:291–296.
- Alonso ME, Bello MJ, Gonzalez-Gomez P, et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes in oligodendrogliomas and ependymomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;144:134–142.
- Tong CY, Ng HK, Pang JC, et al. Molecular genetic analysis of non-astrocytic gliomas. *Histopathology* 1999;34:331–341.
- Suzuki Soiwaki T. Amplification and overexpression of mdm2 gene in ependymomas. *Mod Pathol* 2000;13:548–553.
- Kramer DL, Parmiter AH, Rorke LB, et al. Molecular cytogenetic studies of pediatric ependymomas. *J Neurooncol* 1998;37: 25–33.
- Reardon DA, Entrekina RE, Sublett J, et al. Chromosome arm 6q loss is the most common recurrent autosomal alteration detected in primary pediatric ependymoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;24:230–237.
- Carter M, Nicholson J, Ross F, et al. Genetic abnormalities detected in ependymomas by comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer* 2002;86:929–939.
- Jeuken JW, Sprenger SH, Wesseling P. Comparative genomic hybridization: Practical guidelines. *Diagn Mol Pathol* 2002;11: 193–203.
- Dyer S, Prebble E, Davison V, et al. Genomic imbalances in pediatric intracranial ependymomas define clinically relevant groups. *Am J Pathol* 2002;161:2133–2141.
- Korshunov A, Golanov A, Timirgazi V. P14ARF protein (fl-132) immunoreactivity in intracranial ependymomas and its prognostic significance: An analysis of 103 cases. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001;102:271–277.
- Rousseau E, Ruchoux MM, Scaravilli F, et al. CDKN2A, CDKN2B and p14ARF are frequently and differentially methylated in ependymal tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2003;29:574–583.
- Stuart ET, Kiousi C, Aguzzi A, et al. Pax5 expression correlates with increasing malignancy in human astrocytomas. *Clin Cancer Res* 1995;1:207–214.
- Mihara Y. Establishment and characterization of 5 cell lines derived from human grain tumors. *Kumamoto Med J* 1986;39:25–41.
- Brisson C, Lelong-Rebel I, Mottolèse C, et al. Establishment of human tumoral ependymal cell lines and co-culture with tubular-like human endothelial cells. *Int J Oncol* 2002;21:775–785.
- McLendon RE, Fung KM, Bentley RC, et al. Production and characterization of two ependymoma xenografts. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:540–548.
- Takahashi T, Mitsunashi N, Furuta M, et al. Apoptosis induced by heavy ion (carbon) irradiation of two human tumours with different radiosensitivities in vivo: Relative biological effectiveness (RBE) of carbon beam. *Anticancer Res* 1998;18:253–256.

36. Horowitz ME, Parham DM, Douglass EC, et al. Development and characterization of human ependymoma xenograft hxbr5. *Cancer Res* 1987;47:499–504.
37. Vassal G, Boland I, Santos A, et al. Potent therapeutic activity of irinotecan (CPT-11) and its schedule dependency in medulloblastoma xenografts in nude mice. *Int J Cancer* 1997;73:156–163.
38. Mattern J, Bak M, Hahn EW, et al. Human tumor xenografts as model for drug testing. *Cancer Metastasis Rev* 1988;7:263–284.
39. Neely JE, Ballard ET, Britt AL, et al. Characteristics of 85 pediatric tumors heterotransplanted into nude mice. *Exp Cell Biol* 1983;51:217–227.
40. Castellano-Sanchez AA, Schemankewitz E, Mazewski C, et al. Pediatric chordoid glioma with chondroid metaplasia. *Pediatr Dev Pathol* 2001;4:564–567.
41. Hamilton RL, Pollack IF. The molecular biology of ependymomas. *Brain Pathol* 1997;7:807–822.

## 2.5. CONCLUSION

Dans ce groupe de tumeurs de l'enfant, nous avons réussi à démontrer que les gènes les plus souvent méthylés ne sont pas les mêmes que ceux qui sont méthylés dans les cancers de l'adulte. Des pistes dans ce sens existaient déjà dans la littérature démontrant que les épendymomes de l'enfant et des adultes ne présentaient pas le même profil (Rousseau, 2003). Actuellement, le profil de méthylation des cancers de l'adulte tel que le cancer du sein et du poumon, et certains tumeurs du cerveau ont été étudiés (Topaloglu, 2004), mais il n'existe pas de grandes séries de tumeurs cérébrales de l'enfant.

Dans notre étude nous avons observé une fréquence élevée de méthylation du gène RASSF1A (56%) et des gènes de la voie TRAIL, surtout CASP8 (30%) dans les épendymomes. Dans la littérature, l'étude d'Alonso et al. (Alonso, 2004) a seulement rapporté une méthylation de CASP8 dans les 27 épendymomes testés. Les différences sont probablement liées au fait que les populations et le matériel biologique étudié sont différents (épendymomes de grade différent; tissus congelés versus tumeurs en paraffine).

Les papillomes du plexus choroïde présentaient aussi une fréquence élevée de la méthylation des gènes de la voie TRAIL. Ce résultat est compréhensible, vu que ces gènes ont un rôle dans l'apoptose. Par contre, aucune méthylation des gènes liés à l'invasion et aux métastases n'a été observé dans ces tumeurs. De la même façon, RAR $\beta$  et BLU étaient respectivement méthylés dans 14,8% et 13,6% des épendymomes et dans aucun papillome.

FHIT était méthylé dans 22% des épendymomes et dans aucun papillome du plexus choroïde. Quand nous regardons la littérature, nous observons que FHIT est inactivé dans 60 % de la plus grande partie des tumeurs humaines (de 20 à 100%, selon le type tumoral) ce qui fait de lui le gène le plus fréquemment altéré par méthylation dans les tumeurs humaines (Pekarsky, 2002).

La perte d'expression de p16, souvent associée à l'hyperméthylation, a été observée non seulement dans les tumeurs astrocytaires mais aussi dans les tumeurs oligodendrogiales (Costello, 1996 ; Ueki, 1996). Dans notre série 3 des 27 épendymomes de l'enfance montraient une hyperméthylation de ce gène (11%). Ce résultat est comparable avec des certaines données de la littérature (Alonso, 2004), mais discordant avec d'autres (Rousseau, 2003). Rousseau et al

ne décrivent aucune méthylation de p16 dans les épendymomes de grade II de la fosse postérieure des enfants (Rousseau, 2003). Cette discordance peut être due à des caractéristiques différentes des prélèvements anatomopathologiques (centre différent, tissus en paraffine versus congelé) ou simplement parce que les séries d'épendymomes intracrâniens de l'enfant sont encore trop restreintes pour permettre une vision globale des anomalies épigénétiques.

Nous avons aussi effectué une étude plus précise sur la méthylation des gènes localisés sur le chromosome 22. Nous avons fait l'hypothèse que la méthylation pourrait être un mécanisme complémentaire à la délétion dans l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur de cette région. Le choix des gènes étudiés a été fait après une révision de la littérature. Le gène INI1, qui est impliqué dans la répression et l'activation de la transcription, est muté dans les tumeurs rhabdoïdes de l'enfant et dans plusieurs tumeurs du système nerveux central (Sevenet, 1999). Le gène NF2 et le gène TIMP3 qui avaient été décrits comme hyperméthylés dans certains épendymomes (Alonso, 2004), et le gène EP300 localisé aussi sur 22q mais pour lequel l'étude de la méthylation n'avait jamais été réalisée. Dans notre étude, aucune hyperméthylation de ces quatre gènes n'a été observée. Ces résultats sont différents de ceux d'Alonso. Ceci est probablement dû à l'hétérogénéité de la population et la petite taille des groupes étudiés.

Nous avons ensuite évalué la méthylation comme marqueur pronostique. Nous n'avons pas trouvé une relation statistiquement significative.

Cependant, nos résultats ainsi que ceux de la littérature, laissent supposer que les épendymomes ont un profil de méthylation spécifique, non aléatoire, représentatif du développement et de l'évolution tumorale. En fait, seuls les gènes décrits comme méthylés dans les études de lignées cellulaires et fréquemment méthylés dans les cancers de l'enfant étaient aussi altérés dans notre étude. Les altérations épigénétiques pourraient éventuellement être utilisées à l'avenir pour le diagnostic différentiel et la détection précoce d'une rechute, en recherchant ces anomalies dans des liquides biologiques comme le liquide céphalorachidien.

Dans la deuxième étude il a été démontré que les modifications de la voie de p53 pourraient éventuellement être corrélées à la radiorésistance de ces tumeurs, mais une seule xénogreffe présentait des anomalies de p53 après l'irradiation. Cette tumeur a répondu au traitement radiothérapeutique et des zones de nécrose et d'apoptose ont été observées. Le rôle des altérations au niveau des voies de p53 dans les épendymomes de l'enfant n'est pas encore très clair, mais il ne semble pas être le mécanisme principal d'évolution des ces tumeurs.

## 3.

# LES NEUROBLASTOMES

---

### 3.1. ASPECTS HISTOLOGIQUES ET CLINIQUES

Les tumeurs neuroblastiques (neuroblastomes, ganglioneuroblastome et ganglioneurome) sont dérivées des cellules de la crête neurale primordiale. Le degré, le type de différenciation, et la localisation de la sympathogonie après la migration à partir de la crête neurale donnent naissance aux différents tissus normaux du système nerveux sympathique, incluant les ganglions spinaux sympathiques et les cellules chromaffines de la surrénale. Les sous-types histologiques des tumeurs neuroblastiques semblent en fait être corrélés avec les formes normales de différenciation du système nerveux sympathique. La classification anatomo-pathologique actuellement la plus utilisée est la classification de Shimada modifiée en 1999 (Shimada, 1999) qui classe les tumeurs neuroblastiques en quatre catégories morphologiques :

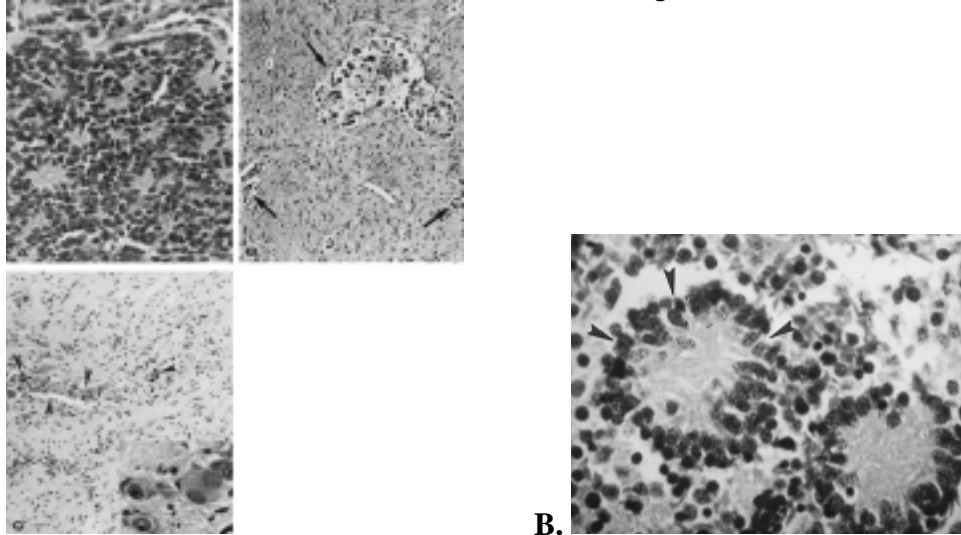
1. Neuroblastome (Schwannian pauvre en stroma)
2. Ganglioneuroblastome (Schwannian riche en stroma)
3. Ganglioneurome (Schwannian stroma-dominante)
4. Ganglioneuroblastome, nodulaire (composée, Schwannian riche en stroma/ stroma-dominante et pauvre en stroma)

Histologiquement, le neuroblastome est une des néoplasies à « petites cellules rondes bleues » de l'enfant ; ce groupe inclut aussi les sarcomes d'Ewing, les lymphomes non Hodgkiniens, les tumeurs primitives neuroectodermiques (PNET) et les sarcomes non différenciés du tissu mou. Le neuroblastome typique est composé de cellules de taille uniforme avec un noyau hyper chromatique, dense et peu de cytoplasme. La présence de neuropile est la caractéristique pathognomonique de tous les neuroblastomes exceptés les plus primitifs. La pseudo rosette de Homer-Wright, une autre caractéristique observée dans 15 à 50 % des cas, est composée de neuroblastes autour des régions de neuropiles éosinophiles (Figure 24).



**Figure 24. Les catégories des tumeurs neuroblastiques**

A. Neuroblastome (haut à gauche), ganglioneuroblastome (haut à droite) et ganglioneurome (en bas). B. Pseudo-rosettes de Homer-Wright.



**A.** **B.**  
*D'après Principles and Practice of Pediatric Oncology, Lippincott Williams & Wilkins, 2002*

Le neuroblastome est la tumeur extra crânienne solide la plus fréquente chez les enfants de moins de 5 ans, représentant entre 8% à 10% de tous les cancers de l'enfance. La prévalence est d'environ 1 cas pour 7000 naissances. Plusieurs évidences indiquent que cette incidence est assez uniforme dans le monde, au moins dans les pays industrialisés. Cette tumeur est légèrement plus fréquente chez les garçons, avec une relation homme : femme de 1,1 :1,0. Le neuroblastome est presque exclusivement une néoplasie pédiatrique et est le cancer le plus commun dans la période néonatale. Son étiologie est inconnue dans la plus grande partie des cas. Quelques études ont essayé d'établir une relation entre la tumeur et certaines expositions intra-utérines, mais aucune n'a pu être démontrée et confirmée par de plus grandes cohortes (Brodeur, 2002).

La présentation clinique est très variable et dépendante de la localisation initiale de la tumeur, de la taille et de l'extension locale et métastatique de la tumeur. Les symptômes les plus fréquents sont la douleur (34%), la fièvre (28%) et la perte de poids (21%). Mais, la majorité des neuroblastomes, principalement ceux de stade 1 ou 2, sont asymptomatiques et sont détectés de façon fortuite.

Pourtant, il existe des symptômes rares mais caractéristiques qui sont très indicatif d'un neuroblastome. Ce sont:

- Une paralysie du membre inférieur liée à une extension intra spinale épидurale d'une tumeur primitive para spinale (4%) ;
- Une diarrhée sévère qui ne répond pas au traitement standard, elle est due à la production du peptide vasoactive intestinal (VIP) par les cellules tumorales (4%) ;
- Une encéphalopathie cérébelleuse aiguë caractérisée par une ataxie cérébelleuse, des mouvements oculaires rapides et aléatoires (opsoclonus), et des mouvements myocloniques (2-8%) ;
- Un Syndrome de Horner, chez les patients qui ont des lésions des ganglions sympathiques du haut du thorax ou cervicaux (1-7%) ;
- Une hypertension, un flushing, et des périodes de sueur excessives occasionnelles causées par une augmentation de la concentration en catécholamines (Syndrome catécholominergique) (0 - 2%) (Schwab, 2003).

Le bilan nécessaire pour déterminer le stade clinique inclut des myélogrammes et une biopsie de moelle osseuse bilatérale, un scanner du thorax, de l'abdomen et pelvien et une scintigraphie au MIBG.

Ces tumeurs présentent des variations importantes aussi bien de localisation comme de degré de différenciation histopathologique. Nous pouvons observer, par exemple, des neuroblastomes qui présentent une régression spontanée sans traitement et d'autres qui présentent un comportement extrêmement agressif avec une évolution rapide vers des stades métastatiques. En effet, les cellules des neuroblastomes 4S, une forme particulière de neuroblastome métastatique de l'enfant de moins de un an, décrite initialement par W. Pepper (Pepper, 1901), peuvent se différencier et entraîner une régression spontanée (Haas, 1988). Toutes ces observations ont démontré qu'il s'agit histologiquement de la même maladie mais de plusieurs pathologies différentes du point de vue génétique et pronostique. La classification en stades distingue trois groupes cliniques de maladies : la maladie métastatique de stade IV, la maladie disséminée de stade IVS spécifique du nourrisson, et les neuroblastomes localisés de stades I, II et III. Pour les neuroblastomes métastatiques, l'âge influence très fortement le pronostic puisque le taux de survie est de moins de 30 % à cinq ans chez l'enfant de plus de 1 an,

alors qu'il est de 70 % à cinq ans chez le nourrisson de moins de 1 an. Dans les stades localisés I et II, ou encore dans les neuroblastomes de stade IVS, le taux de survie est de 90 %. Dans l'intention de différencier ces tumeurs et d'adapter le traitement à l'agressivité, plusieurs études ont été réalisées pour caractériser des facteurs pronostiques. Actuellement, les facteurs cliniques bien connus sont l'extension de la maladie (Tableau 2) et l'âge (les enfants de moins d'un an ayant un meilleur pronostic quel que soit le stade (Breslow, 1971)), auxquels s'ajoutent les facteurs biologiques tels que le contenu d'ADN des cellules tumorales, la délétion du chromosome 1p et l'amplification de l'oncogène NMYC qui seront plus largement discutés dans le chapitre suivant. Pendant les dernières années, une amélioration substantielle de la survie des nouveau-nés ainsi que celle des enfants plus âgés avec un neuroblastome localisé ou régional a été observée. De même, le suivi des enfants plus âgés avec une maladie métastatique au diagnostic a été modérément amélioré. La capacité de différencier des sous-groupes pronostiques de patients basé sur la clinique et sur des caractéristiques biologiques a permis une meilleure compréhension du risque relatif de rechute et donc, du développement d'un traitement lié au risque et pas seulement à l'âge ou au stade clinique (Tableau 3).

**Tableau 2. Classification INSS**

**Stade 1** Tumeur localisée avec une exérèse macroscopiquement complète, avec ou sans résidu microscopique ; les ganglions homolatéraux sont histologiquement sains (les ganglions adhérents à la tumeur et enlevés avec elle peuvent être envahis).

**Stade 2A** Tumeur localisée avec une exérèse macroscopiquement incomplète; les ganglions homolatéraux non adhérents sont histologiquement sains (les ganglions adhérents à la tumeur et enlevés avec elle peuvent être envahis).

**Stade 2B** Tumeur localisée avec ou sans exérèse macroscopique complète avec ganglions homolatéraux non adhérents à la tumeur envahis histologiquement. Les adénopathies controlatérales doivent être histologiquement saines.

**Stade 3** Tumeur latéralisée inextirpable, infiltrant la ligne médiane, avec ou sans envahissement ganglionnaire régional, ou tumeur latéralisée avec envahissement ganglionnaire controlatéral, ou tumeur médiane avec extension bilatérale par elle-même ou par un envahissement ganglionnaire.

**Stade 4** Toute tumeur primitive avec dissémination à distance dans les ganglions, l'os, la moelle osseuse, le foie et/ou d'autres organes (sauf si cela correspond à la définition des Stades 4S).

**Stade 4S** Tumeur primitive localisée (comme définie pour les Stades 1, 2A ou 2B), avec dissémination hépatique, cutanée et/ou au niveau de la moelle osseuse. (Restreint aux enfants de moins de 1 an).

Le traitement actuel est adapté à ces différences. Des protocoles spécifiques à chaque groupe sont en cours d'évaluation et consistent en une chimiothérapie initiale avec une chirurgie secondaire. La chimiothérapie à haute dose aussi bien que la radiothérapie est indiquée dans des situations précises (Tableau 3).

**Tableau 3. Différentes approches thérapeutiques des neuroblastomes de l'enfant**

Age < 1 an	NMYC non amplifié	Localisé opérable	Chirurgie seule
		Localisé inopérable	Chimiothérapie minimale Chirurgie
		Métastatique sans atteinte osseuse radiologique (stade 4s)	Chimiothérapie intense et brève Chirurgie
		Métastatique avec atteinte radiologique (stade 4)	Chimiothérapie intense Chirurgie
	NMYC amplifié	Stade > ou = 2	Chimiothérapie Chirurgie Chimiothérapie à hautes doses Irradiation Locale
Age > 1 an	Quelque soit le statut NMYC	Stade 4	Chimiothérapie Chirurgie
	NMYC amplifié	Stade > ou =2	Chimiothérapie à hautes doses +/- Irradiation Locale +/- Acide rétinoïque
	NMYC non amplifié	Localisé opérable	Chirurgie seule, sauf pour les types 2 (chimiothérapie)
		Localisé inopérable	Chimiothérapie Chirurgie

*Adapté des protocoles Neuroblastome de la SFCE.*

### 3.2. ASPECTS CYTOGENETIQUES

Des découvertes récentes dans la génétique des neuroblastomes ont permis une meilleure compréhension des mécanismes d'évolution de cette maladie aussi bien que de l'hétérogénéité biologique. En fait, le neuroblastome est un exemple remarquable de cancer pour lequel les altérations génétiques et biologiques sont déterminantes dans la définition du traitement et le suivi du patient.

### 3.2.1. La ploïdie ou contenu ADN des cellules tumorales

La méthode actuelle la plus simple et semi-automatique pour l'étude de l'index ADN est la cytométrie en flux. Dans une cellule diploïde (nombre de chromosomes égaux à  $2N$ ), l'index d'ADN est de 1. Des études réalisées par Look (Look, 1991) ont démontré que la détermination de l'index ADN dans les neuroblastomes des enfants donne une information pronostique importante. Chez les 298 enfants étudiés, l'hyper diploïdie était associée aux stades moins avancés et à une meilleure survie, alors que la diploïdie était liée aux stades avancés et à la moindre efficacité du traitement. En fait, les tumeurs proches de la triploïdie présentent un meilleur pronostic que les tumeurs diploïdes ou tétraploïdes ( $2N$  et  $4N$ ) (Bowman, 1997).

Kaneko (2000) a proposé une hypothèse pour expliquer comment le statut de ploïdie tumorale détermine l'hétérogénéité clinique des neuroblastomes (Kaneko, 2000a). Ces tumeurs, quelle que soit leur ploïdie sont issues du même événement génétique : la mutation d'un gène suppresseur de tumeur avec un effet récessif au niveau cellulaire. La tétraploidisation et la division multipolaire subséquente d'une cellule diploïde hétérozygote avec une mutation de ce gène donnerait naissance à des cellules filles diploïdes ou tétraploïdes sans un allèle normal et un phénotype très malin, ou à des cellules filles triploïdes avec au moins un allèle normal et un phénotype moins malin (Westermann, 2002).

### 3.2.2. L'amplification du proto-oncogène NMYC

Le gène NMYC est localisé sur le bras court du chromosome 2 et son statut (amplifié ou non) est étudié par cytogénétique. L'amplification de NMYC est observée dans 25-30% des neuroblastomes. Il a été démontré que cette amplification était associée à un comportement plus agressif de la tumeur. En fait, des études réalisées par plusieurs groupes ont montré une corrélation significative entre l'amplification de NMYC et les stades avancés de la maladie. Dans une des premières études publiées, l'amplification de NMYC a été observée dans 24 des 48 (50%) tumeurs de stade 3 et 4, mais n'a pas été détectée dans les 15 tumeurs de stade 1 et 2 (Brodeur, 1984). En absence de l'amplification de NMYC, la survie globale était approximativement de 60% à 5 ans, mais de seulement 10% chez les patients ayant NMYC amplifié (Seeger, 1985). Dans des analyses multivariées, l'amplification de NMYC est le seul facteur génétique ayant apporté une information pronostique significative aux variables cliniques

comme l'âge et le stade (Berthold, 1997). Actuellement, le statut de NMYC est la seule variable biologique utilisée dans la stratification du traitement des neuroblastomes (Tableau 3).

#### *2.3.2.2.I.1. L'Expression de CD44*

CD 44 est une glycoprotéine multifonctionnelle qui a un rôle dans les interactions cellule-cellule et cellule – matrice (Underhill, 1992). Dans plusieurs modèles animaux, l'expression des isoformes spécifiques de CD44 a été corrélée à l'augmentation du potentiel métastatique (Gunthert, 1991; Hofmann, 1991), et dans la majorité des études chez l'homme la surexpression de CD44 a été associée à la progression et à la dissémination de la tumeur (Bartolazzi, 1994). Un nombre limité de tumeurs, comme le carcinome de la prostate (Gao, 1997) et les neuroblastomes (Favrot, 1993, Gross, 1994), expriment des taux bas ou nuls de CD44. Le gène CD44 a été décrit comme un GST localisé dans le bras court du chromosome 11 (Gao, 1997).

Gross et al, en 1995 ont démontré que la majorité des neuroblastomes n'exprime pas CD44 (Gross, 1995) et aucune des isoformes n'a pu être détectée. Quelques années avant, il avait déjà été mis en évidence que, contrairement aux tumeurs des adultes, l'expression de CD44 était corrélée aux stades localisés et matures des neuroblastomes. Cette expression représente donc un marqueur de pronostic favorable (Favrot, 1993). En effet, il existe une forte relation inverse entre l'absence d'expression de CD44 et l'amplification de NMYC ce qui suggère un rôle de NMYC dans la régulation de CD44. Dans une autre étude Gross et al (2000) ont démontré que NMYC est lié à l'expression d'un récepteur non-fonctionnel de CD44.

### **3.2.3. Délétion du 1p**

La délétion du bras court du chromosome 1 fut la première anomalie cytogénétique découverte dans les neuroblastomes par l'étude du caryotype tumoral (Brodeur, 1977). Elle est observée dans 25-40% des neuroblastomes. Récemment, une grande série de 238 cas a été étudiée. Dans cette étude, la perte de 1p36 était un facteur prédictif indépendant défavorable de la survie, mais n'a pas eu d'incidence sur la survie globale en analyse multivariée (Maris, 2000). Par contre, l'amplification de NMYC reste un facteur pronostic très fort pour la survie globale. Ces résultats impliquent que la détermination du statut allélique de 1p36 peut être utile pour

différencier les neuroblastomes qui, malgré des caractéristiques cliniques et biologiques favorables, ont plus de chance de présenter une progression de la maladie.

L'effet biologique de la délétion de 1p n'est pas connu. En effet, la complexité génomique de cette région et la grande taille des délétions rendent difficile la recherche d'un gène localisé dans cette région lié à la tumorigenèse des neuroblastomes. Plusieurs gènes candidats ont été proposés, mais aucun n'a montré des mutations spécifiques dans ce type de tumeur, indiquant que des mécanismes alternatifs d'inactivation telle que l'épigénétique doivent être considérés. La délétion du 1p peut être isolée ou associée de façon variable avec d'autres altérations génétiques comme l'amplification de NMYC, le gain du 17q, la diploïdie/triploïdie, et chaque combinaison semble avoir un impact différent dans les caractéristiques de croissance tumorale (Tableau 4).

### 3.2.4. Trisomie du 17q

La trisomie du 17q ou les gains partiels du segment 17q sont observés dans 50 à 75% des neuroblastomes. Il s'agit donc de l'altération génétique la plus fréquente dans les neuroblastomes (Plantaz, 1997).

Le gain de 17q est plus fréquent dans les stades avancés, dans les tumeurs des enfants de plus d'un an, dans les tumeurs qui présentent une perte du 1p, une amplification de NMYC et une di ou tétraploïdie. Les résultats d'une compilation des données de six centres européens (313 cas) semblent suggérer que le gain de 17q est un facteur pronostique indépendant (Bown, 1999). Le gain de 17q semble donc être lié à un sous-type plus agressif de neuroblastome.

**Tableau 4. Groupes de risque de neuroblastomes selon les facteurs biologiques**

Caractéristique	Type 1	Type 2	Type 3
Ploïdie	Triploïde	Diploïde	Diploïde
NMYC	Non amplifié	Non amplifié	Amplifié
Délétion 1p	Non	Incertain	Oui
Stades Majoritaires	1, 2 ou 4S	3 ou 4	4
Survie	>90%	25-50%	5%

L'effet biologique de ce gain n'est pas clairement établi. Il a une base complexe, non seulement liée aux gènes du point de cassure du chromosome 17, mais aussi liée au fait que ce gain est fréquemment associé à une translocation entre le chromosome 1 et 17 ou à une délétion dans un chromosome partenaire, le plus souvent 1p, suivi par 11q (Kaneko, 2000b). Les combinaisons spécifiques des modifications génétiques, incluant la délétion de 1p et l'amplification de NMYC sont utilisées pour identifier des types génétiquement différents de progression tumorale (Brodeur, 1997) (Tableau 4).

### **3.3. ASPECTS EPIGENETIQUES**

Les anomalies cytogénétiques les mieux caractérisées dans les neuroblastomes (amplification de NMYC, perte de 1p et gain du 17q) ne sont retrouvées que dans 25 à 50 % des tumeurs neuroblastiques (Oppenheimer, 2003). Il est donc nécessaire de trouver d'autres marqueurs qui puissent permettre de distinguer biologiquement ces tumeurs. Actuellement, d'autres altérations non aléatoires ont été démontrées dans les neuroblastomes : l'inhibition de la transcription par des modifications épigénétiques (Tableau 5).

#### **3.3.1. CASP8**

L'analyse des gènes liés à l'apoptose dans les lignées cellulaires de neuroblastome a permis d'observer des anomalies dans un des plus importants gènes suppresseurs de tumeur : CASP8. En fait, une baisse ou une absence d'expression de la caspase 8 a été détectée dans une série de lignées cellulaires de neuroblastomes (Teitz, 2000). Dans ces lignées, l'expression du gène de CASP8 était inhibée par méthylation. Les mutations ponctuelles du gène de CASP8 dans les neuroblastomes sont rares, indiquant que l'inactivation a lieu principalement par délétion et méthylation.



**Tableau 5. Publications et résultats sur les études épigénétiques des neuroblastomes**

Référence	N	Gènes étudiés	Méthylation (%)
Harada, 2002	Tumeurs = 27 Lignées = 11	RASSF1A CDH1 GSTP1 p16 MGMT APC DAPK RAR $\beta$ CDH13	52 6 3 0 0 0 0 0 0
Gonzalez-Gomes, 2003	Tumeurs = 38	THBS-1 TIMP3 MGMT p73 RB1 DAPK, p14, p16, CASP8 TP53	64 30 27 25 18 14 0
Yang, 2004	Lignées = 13 Tumeurs = 56	RASSF1A  TSP1  CASP8	100 (lignées) 64 (Tumeurs)  84 (Lignées) 56 (Tumeurs)  84
Alaminos, 2004	Lignées= 10 Tumeur = 145	DR4 HOXA9 LMX-1 TMS1 RIZ1 CCND2 p16 FOLH1 SYK RAR $\beta$	50 39 32 31 26 25 19 18 12 7
Abe, 2005	Tumeur = 140	RASSF1A BLU DFKZ PCDHB1 p16 hMLH1 PCDHB1 TAF7 P41Arc SIM2	44 20 4 0 0 0 0 0 0 0 0

### 3.3.2. DcR1, DcR2, TRAIL

Dans les lignées cellulaires de neuroblastomes, des méthylations des récepteurs de la voie TRAIL ont été décrites et comparées à des tissus normaux qui ne présentaient pas cette anomalie. DcR2 qui code pour un récepteur des voies d'apoptose, présente un profil de

méthylation complètement différent dans les ganglioneuromes, qui sont des tumeurs bénignes, par rapport aux neuroblastomes. Ce gène a été rapporté méthylé surtout dans les tumeurs de croissance rapide et avec une diminution de la survie (Banelli, 2005). L'autre donnée importante est que le traitement par des agents déméthylants (5-aza-2'deoxycytidine) a entraîné une déméthylation partielle de ces lignées cellulaires et a rétabli l'expression de ces gènes (van Noesel, 2002).

### **3.3.3. RASSF1A**

Récemment, un nouveau gène candidat localisé au locus 3p21.3, RASSF1A, a été identifié et des analyses ont démontré que sa transcription est inhibée par la méthylation de son promoteur dans les neuroblastomes (Dammann, 2000 ; Astuti, 2001). Elle est également fréquente dans d'autres tumeurs de l'enfance comme le néphroblastomes, le lymphome de Burkitt et le carcinome hépatocellulaire (67% de toutes les tumeurs) (Wong, 2004). RASSF1A n'est pas méthylé dans les ganglioneuromes (Harada, 2002). Dans les lignées cellulaires de neuroblastome, RASSF1A est méthylé dans 100% des cas (Yang, 2004). Des analyses ont montré une corrélation entre la méthylation de RASSF1A et CASP8 dans les neuroblastomes, suggérant qu'un sous type de neuroblastomes pourrait avoir un phénotype de méthylation spécifique.

Depuis 2003, plusieurs laboratoires étudient une corrélation entre l'évolution des neuroblastomes et la méthylation des gènes (Tableau 5). Ils ont montré que la méthylation des gènes suppresseurs dans les neuroblastomes de l'enfant n'est pas un événement aléatoire. Ces auteurs suggèrent que la méthylation pourra être utilisée dans le futur comme cible diagnostique et thérapeutique dans ces tumeurs.

### 3.4. TRAVAIL DE RECHERCHE

Depuis la découverte de NMYC comme un marqueur biologique de pronostic, un groupe de neuroblastomes plus agressifs a été définis. Actuellement, il est important de trouver d'autres marqueurs qui puissent permettre la différenciation entre les tumeurs qui ne présentent pas d'anomalies cytogénétiques. Au moment où nous avons démarré notre étude, aucun article n'avait été publié sur ce sujet.

Nos hypothèses initiales étaient :

1. qu'un des mécanismes d'oncogenèse dans les neuroblastomes de l'enfant est la méthylation ;
2. que les neuroblastomes de l'enfant présentent un profil de méthylation particulier à ce type de tumeur (« méthylotype ») ;
3. que la méthylation permet la distinction des différents stades cliniques et peut être utilisée comme marqueur d'agressivité tumorale avec l'amplification NMYC.

Nos objectifs initiaux étaient donc de décrire les gènes les plus fréquemment méthylés dans les neuroblastomes de l'enfant, de tracer un profil de méthylation et de voir s'il existe une relation statistiquement significative entre la méthylation des gènes et le stade clinique ou le pronostic dans ces tumeurs de l'enfance.

19 gènes suppresseurs de tumeurs ont été étudiés dans soixante-deux neuroblastomes (quarante cinq tumeurs primitives et dix-sept rechutes). Les résultats ont été comparés aux données cliniques et biologiques tels que la rechute, le décès ou l'amplification de NMYC.

### **3.4.1. La méthylation de RASSF1A dans le cadre des neuroblastomes**

#### *I. Publication n. 3*

Methylation of tumor suppressor genes in neuroblastome: The RASSF1A gene is almost always methylated in primary tumors.

Mariana Bohns Michalowski, Florence de Fraipont, Dominique Plantaz, Sylvie Michelland, Valérie Combaret, Olivier Delattre, Marie-Christine Favrot.

En cours de soumission après révision du manuscrite à Pediatric Blood and Cancer.

## **II. Résumé**

Le neuroblastome (NB), tumeur solide extracranienne la plus fréquente chez les enfants, a une évolution qui peut varier de la progression tumorale rapide à la régression spontanée. Actuellement, les altérations génétiques les mieux caractérisées sont l'amplification de NMYC, la perte de 1p et le gain de 17q. L'amplification de NMYC a été clairement liée au pronostic. Grâce à l'association des classifications cliniques et biologiques, les protocoles de traitement ont pu être améliorés et adaptés pour un patient donné.

Actuellement, quelques GST ont été décrits comme fréquemment méthylés dans les neuroblastomes de l'enfant. Le gène de la caspase 8 et les récepteurs des facteurs de nécrose : DR4, DR5, DcR1 et DcR2 sont des exemples. En outre, Teitz et al. (2000) ont observé une corrélation entre la méthylation CASP8 et l'amplification de NMYC. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que des altérations épigénétiques soient liées à la tumorigenèse et à l'évolution des neuroblastomes.

Soixante deux neuroblastomes (45 tumeurs primitives et 17 rechutes) ont été étudiés au niveau de la méthylation de 19 gènes (p15INK4a, p16INK4a, p14ARF, APC, RB1, RASSF1A, BLU, FHIT, RAR $\beta$ , INI1, TIMP3, NF2, MGMT, DAPK, FLIP, ECAD, CASP8 et les récepteurs DcR1 et DcR2).

Au moment du diagnostic, nous avons observé la méthylation de RASSF1A dans 93% des tumeurs, la méthylation de TIMP3 dans 51%, de CASP8 dans 38.1%, de BLU dans 34.1%, de DcR1 dans 10.5%, de DcR2 dans 25%, et de p15 dans 9%. Toutes les tumeurs testées au moment de la rechute avaient une méthylation de RASSF1A (100%), et 10 avait une méthylation de TIMP3 (59%), 6 de CASP8 (35%), 3 de DcR1 (18%), 5 de DcR2 (29%) et 4 de BLU (24%). La méthylation était corrélée au stade clinique: les neuroblastomes de stade 1, 2 et 4s présentaient moins de gènes méthylés que ceux des stades 3 et 4 ( $p = 0.002$ ).

En conclusion, les résultats de notre série indiquent que la méthylation de gènes suppresseurs de tumeurs peut être un mécanisme intéressant dans le développement et l'évolution des neuroblastomes. Ces altérations épigénétiques pourraient donc être utilisées comme des marqueurs de la maladie et les gènes qui régulent la méthylation pourraient être considérés comme de nouvelles cibles thérapeutiques.

METHYLATION OF TUMOR SUPPRESSOR GENES IN NEUROBLASTOMA: THE  
RASSF1A GENE IS ALMOST ALWAYS METHYLATED IN PRIMARY TUMORS

Mariana Bohns Michalowski<sup>1, 4</sup>, Florence de Fraipont <sup>1,4</sup>, Dominique Plantaz <sup>3</sup>  
Sylvie Michelland <sup>1,4</sup>, Valérie Combaret <sup>2</sup>, Marie-Christine Favrot <sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup> Centre d'Innovation en Biologie, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble,  
France

<sup>2</sup> Centre Leon Berard, Lyon, France

<sup>3</sup> Service de Pédiatrie, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, France

<sup>4</sup> INSERM U578, Institut Albert Bonniot, 38 700 La Tronche, France

***Correspondence to:***

Marie-Christine Favrot  
Centre d'Innovation en Biologie  
Département de Biologie Intégrée – Pavillon B  
CHU de la Tronche  
Grenoble – 38043  
France  
e-mail : MCFavrot@chu-grenoble.fr  
phone : +33 (0) 476.76.51.47  
fax : +33 (0) 476.76.56.64

Abstract word count : 250 words ; Text word count :4788 words ; Number of tables : 3; Number of  
figures: 1

Running title: Methylation in neuroblastoma

Keywords: Methylation, neuroblastoma, epigenetics, cancer.

## ***ABSTRACT***

Background: The evolution of neuroblastoma, the most common extracranial solid cancer diagnosed in infancy and childhood, can range from rapid tumor progression to spontaneous regression. Currently, the best-characterized genetic aberration in neuroblastoma is MYCN amplification, which has been clearly related to prognosis. In the present study, we investigated the possibility that specific epigenetic alterations may be associated with prognosis.

Procedure: Sixty-two neuroblastomas (forty-five primary tumors and 17 neuroblastomas at relapse) were studied in terms of the methylation status of 19 genes (p15INK4a, p16INK4a, p14ARF, APC, RB1, RASSF1A, BLU, FHIT, RAR $\beta$ , INI1, TIMP3, NF2, MGMT, DAPK, FLIP, ECAD, CASP8 and the receptors DcR1 and DcR2).

Results: At diagnosis, we found hypermethylation of RASSF1A in 93% of these tumors, hypermethylation of TIMP3 in 51%, of CASP8 in 38%, of BLU in 34%, of DcR2 in 25% and of DcR1 in 11%. All 17 tumors tested at relapse showed hypermethylation of RASSF1A (100%), while 10 showed hypermethylation of TIMP3 (59%), 6 of CASP8 (35%), 5 of DcR2 (29%), 4 of BLU (24%) and 3 of DcR1 (18%). Hypermethylation was related to clinical stage: neuroblastomas at stages 1, 2 and 4s were less frequently methylated than those at stages 3 and 4 ( $p = 0.002$ ).

Conclusion: the results from our series indicate that hypermethylation of tumor suppressor genes may be important in the development and evolution of neuroblastoma. Thus, these epigenetic alterations could be used as a marker of the disease and genes regulating methylation should be considered as possible novel therapeutic targets in neuroblastoma.

## ***INTRODUCTION***

Neuroblastoma (NB), the most common extracranial solid cancer diagnosed in infancy and childhood, may show different evolution: from rapid tumor progression to spontaneous regression (Schwab, 2003; Evans AE, 1976; Matthay, 1999). Currently, the best-characterized genetic aberrations in neuroblastoma are MYCN amplification, loss of 1p, chromosome gain of 17q, and loss of 3p. The first of these has been clearly related to prognosis (Seeger, 1985; Schwab, 1993). Through the combined clinical and biological classification of tumors, therapeutic protocols can be improved and adapted to a specific patient (Shimada, 1999; Westermann and Schwab, 2002; Brodeur, 2003).

During the last 10 years, a new mechanism of tumor development has been described: the hypermethylation of tumor suppressor genes. In addition to point mutations and gene deletions, transcriptional repression by hypermethylation of promoter sequences represents an alternative means of inactivation of tumor-suppressor genes in cancer (Myohanen, 1998; Knudson, 2000). This silencing can be partially relieved by demethylation of the promoter region (Baylin, 2000).

Presently, a few potential tumor suppressor genes have already been described as being frequently hypermethylated and silenced in pediatric neuroblastomas. These include the genes for caspase 8 (CASP-8) and the tumor necrosis factor receptors DR4, DR5, DcR1 and DcR2 (Teitz, 2000; van Noesel, 2002). Some of them appear to be related to prognosis. Teitz et al. (2000) found a relationship between CASP8 hypermethylation and MYCN amplification. We may then hypothesize that an epigenetic alteration is related to the tumorigenesis and evolution of neuroblastoma, since aberrant promoter methylation is associated with a loss of gene function that can provide a selective advantage to neoplastic cells (Jones and Baylin 2002). It is also important to notice that methylation may also be used as an easily detectable cancer marker. We have previously observed that the



methylation pattern does not seem to be randomly assigned in neuroblastomas, and may represent a mechanism of tumor development and evolution. Tracing methylation profile as a diagnostic tool has the advantages of early detection, differential diagnosis and detection of tumor regrowth by a methylation-based molecular diagnostic assay.

In the present study, we tried to investigate the possibility that specific epigenetic alterations are associated with prognosis, since the largely used MYCN amplification seems to underestimate the high-risk group of tumors. A good clinical and biological classification is essential to gear the treatment to the risk of relapse. Also, these epigenetic alterations can be used as a marker of the disease and genes regulating methylation may be considered as possible novel therapeutic targets in neuroblastoma. A total of nineteen genes, including well-characterized tumor suppressor genes involved in cell-cycle regulation (p15INK4a, p16INK4a, p14ARF, RB1, BLU, FHIT, RAR $\beta$ , INI1, NF2), DNA repair genes (MGMT), genes related to cellular liaison, metastasis and invasion (APC, ECAD, TIMP3), genes concerned with apoptosis (DAPK, RASSF1A), genes of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) pathway (CASP8 and the receptors DcR1 and DcR2), and the gene for the negative regulator of CASP8 (FLIP) were analyzed. These genes were chosen because they have previously been described as being methylated in other childhood tumors (Michalowski, 2006) as well as in previous studies on neuroblastoma (Tang, 2004; Banelli, 2005; Yang, 2004). We were able to confirm the high frequency of methylation of CASP8 and TRAIL pathway genes, and RASSF1A hypermethylation in these tumors and the difference in profile compared to adult tumors. Moreover, we found that the number of hypermethylated genes was related to clinical stage.

## **MATERIAL AND METHODS**

### Patients and Tumor Specimens

62 NBs of stage 1–4 and 4s according to INSS from children aged between 1 and 62 months (median 9 months) were evaluated. Forty-five were primary tumors and 17 were tumors at relapse and for two patients we studied tumors at diagnosis and at relapse. Twenty children (45%) were younger than 1 year whereas 25 (55%) were older. Tumor tissues obtained at surgery were frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Only the fragments that were at least 80% tumor-derived were used for analysis. All tumors were previously evaluated for genetic abnormalities by comparative genomic hybridization (Plantaz, 2001).

All patients were treated according to the standard “Société Française d’Oncologie Pédiatrique” (SFOP) protocols and were followed for a median of 35 months (range 3–95 months).

### DNA isolation, Bisulphite Modification and Methylation analysis

DNA samples were extracted with the QIAmp tissue kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. Methylation patterns in the CpG Island were determined by chemical modification of unmethylated cytosines to uracil, leaving methylated CpGs intact. One  $\mu\text{g}$  of genomic DNA modified by treatment with bisulfite was purified using the CpGenome DNA modification kit (Qbiogene, Illkirch, France). Methylation-specific PCR (MSP) was then performed as described by Michalowski et al. The genes studied were p15INK4a, p16INK4a, p14ARF, APC, RB1, RASSF1A, BLU, FHIT, RAR $\beta$ , INI1, TIMP3, NF2, MGMT, DAPK, ECAD, FLIP, CASP8 and the receptor genes DcR1 and DcR2. MSP sensitivity was tested (de Fraipont et al, 2005) and was found to be below 1% of methylated DNA. Controls without DNA were also used for each set of methylation-specific PCR assays. DNA from normal peripheral leukocytes was used as negative control and DNA from normal leukocytes subjected to Sss1 methyltransferase treatment (New

England BioLabs, Beverly, MA) was used as a positive control. PCR products were analyzed on 2.5% agarose gels and visualized after staining with ethidium bromide. If an amplicon for both U- and M-primer or for M-primer alone could be seen, the gene promoter was considered to be methylated. Each PCR was performed twice.

### Statistical Analysis

Statistical analysis data were summarized with frequencies, and  $\chi^2$  or Fischer's exact tests were used to compare proportions between study groups. The Kaplan-Meier method was used to estimate survival probabilities, and survival functions were compared with the log-rank test. For individual tests, a two-sided p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## **RESULTS**

### *Clinical and pathological features of the tumor series*

Forty-five NBs were studied at diagnosis and 17 at relapse. The primary tumors were at different clinical stages: 15.0% stage 1, 27.5% stage 2, 12.5% stage 3, 37.5% stage 4 and 7.5% stage 4s. A sample of these tumors had been previously studied by comparative genomic hybridization (CGH) and by molecular biology-based searching for MYCN amplification and other chromosomal imbalances (MYCN amplification in 26%, 1p deletion in 33%, and 3p deletion in 4%) (Table 1). (Plantaz, 2001). The frequency of NMYC amplification as well as 1p deletion are the same as described in larges series of neuroblastoma and 3p deletion was only observed in stage 4 NMYC non-amplified tumors. Moreover, the well known association of age and MYCN amplification with prognosis was confirmed in our series of tumors with statistically significant association.

### *Frequency of methylation in primary tumors*

Tumor tissues consist of a mixture of malignant and nonmalignant cells (at least 80% of tumoral cells). Then, the unmethylated forms of all genes were presented in almost all samples.

At diagnosis, 43 of the 45 NBs studied showed at least one hypermethylated gene for each tumor (median 2.4; minimum 0, maximum 6) (Table 1). Only two stage-1 tumors of children younger than one year showed no methylation of tumor-suppressor genes. All other NBs, including stage-4s (a unique group of infants who have a very favorable outcome), showed at least one methylated gene. The number of methylated genes was related to stage ( $p = 0.002$ ) (Table 2).

RASSF1A was very frequently methylated (93%) in these tumors at diagnosis. Other frequently methylated genes were TIMP3 in 51% of cases, CASP8 in 38%, BLU in 34 %, DcR2 25%, DcR 1 in 11%, p15 in 9%, RAR  $\beta$  , DAPK and FHIT in 4%, and NF2 in 2%. Nine other genes were tested (p16INK4a, p14ARF, APC, RB1, INI1, NF2, FLIP, ECAD and MGMT) and no hypermethylation was detected (Table 1).

Methylation of BLU and CASP8 was related to clinical stage: stages 1, 2 and 4s has less methylated genes than stages 3 and 4 ( $p = 0.01$ ).

#### *Frequency of methylation in relapse (table II)*

The 17 tumors tested at relapse showed similar results. Hypermethylation of RASSF1A was detected in all 17 (100%), hypermethylation of TIMP3 in 10 (59%), of CASP8 in 6 (35%), of DcR2 in 5 (29%), of BLU in 4 (24%) and DcR1 in 3 (18%). We were not able to observe a change of the methylation profile in tumors at relapse. The two NBs studied at diagnosis and relapse presented exactly the same methylations at both moments: NB 40 (R9) presented methylation of two genes (RASSF1A and TIMP3) and NB 20 (R14) of 4 different genes (RASSF1A, CASP8, DcR1 and DcR2).

#### Clinical significance

We then evaluated whether methylation might be related to survival in primary tumors (Figure 1). No individual methylation was statistically related to survival, but the absence of RASSF1A methylation was only observed in children who were less than 12 months old (two stage-1 NBs and one stage-4s).

The methylation profile of tumors at relapse was very similar to stage 4 tumors. No specific methylation of the genes tested was related to the risk of relapse.

There was no statistically significant relationship between MYCN amplification and CASP8 hypermethylation ( $p = 0.12$ ).

## ***DISCUSSION***

We have studied 19 tumor suppressor genes in 45 primary tumors at different stages and 17 tumors at relapse. Regarding clinical, pathological and biological characteristics, this cohort seems to be a representative one. It was possible to establish a characteristic neuroblastoma profile where 6 genes were very frequently methylated (RASSF1A, TIMP3, CASP8, DcR1, DcR2 and BLU), 4 other genes were less frequently methylated (p15, FHIT, RAR  $\beta$ , DAPK), and 9 genes were never methylated. Among the latter 9 genes, we studied genes that are considered to be important in adult cancers and which are frequently described as being methylated in these tumors (e.g. p16 and MGMT). Thus, it appears that a specific profile exists in pediatric tumors. In our study of children with ependymoma, we observed the importance of CASP8, DcR1 and RASSF1A, but also of FHIT, RAR  $\beta$ , and p16 (Michalowski, 2006). Recently, different neuroblastoma profiles have been described. Banelli et al. (2005) also observed two groups of genes that are prone to methylation in neuroblastic cells to different extents. The first group includes genes that are frequently targets of methylation in adult tumors, but which are not methylated in neuroblastoma (P16, MGMT and RAR $\beta$ , for example) and the second group of genes shows a distinctive pattern of methylation in neuroblastoma (84% RASSF1A and 42% DcR2). Alaminos et al. (2004) also observed the importance of hypermethylation in

providing a global profile. They described that the hypermethylation of TMS1 (a proapoptotic gene) and CCND2 (cell cycle gene) was associated with evolution in stage 4 progressing tumors, but these genes were never methylated in 4S tumors (Alaminos, 2004)

In our study, 96% (43/45) of neuroblastomas had at least one methylated gene. The only two tumors that presented no hypermethylation were stage-1 neuroblastomas in young children of less than 1 year old. We found a correlation between the number of methylated genes, and also hypermethylation of CASP8 and BLU genes, and clinical stage, which indicates that methylation is a tumor-related change occurring early in tumorigenesis.

The high proportion of methylation was found to be mainly due to RASSF1A methylation. This gene is located at 3p21.3, stops the cellular cycle and seems to play an important role in apoptosis (Song, 2004). The methylation of this gene was observed in our series in 93% of primary tumors and 100% of relapsed NBs. This result agrees with some reports in the literature which have found RASSF1A to be hypermethylated in 100% of cell lines and in 50–90% of tumor specimens (Harada, 2002; Astudi, 2001; Alaminos, 2004; Banelli, 2005), although other authors have described a less frequent methylation of this gene and an association with survival (Yang, 2004). In our series, we did not observe this relationship but the only NBs that did not have RASSF1A methylated were tumors with good outcome (grade 1 or 4s in children younger than 1 year). The absence of methylation of RASSF1A appears to define a different biological subgroup of tumors with very good prognosis. Although one of these patients relapsed, probably due to a primary partial resection; he was treated and followed without any further manifestation of disease.

Other genes that were frequently methylated in NBs were CASP8, DcR1, DcR2. Note that the genes methylated are mainly associated with apoptosis. This finding may be explained by the regulatory role of these genes in cellular replication and cellular death control in the initial development of these malignant tumors.

Although an association between CASP8 hypermethylation and MYCN amplification has been described (Teitz 2000, van Noesel, 2003), we observed this methylation in both MYCN amplified and non-amplified NBs (71% and 37.5% of cases, respectively). This difference was not statistically significant ( $p = 0.12$ ), which is in agreement with the study of Yang (2004). It is possible that one might eventually find a statistically significant difference in a larger series.

To our knowledge, no study has described methylation of DcR1 and DcR2 in the same series of tumors or cell lines. The methylation of DcR2 was a little less frequent in our study than in others (Banelli, 2005) and the frequency was the same in MYCN amplified and non-amplified tumors, even if we used exactly the same method and primers. This is possibly due to differences in the samples.

We although found high BLU methylation level. To date, little is known about BLU and neuroblastoma. The only study that has analyzed BLU status in NB was that of Abe et al. (2005). These authors also found that there was frequent promoter methylation of RASSF1A and BLU genes and that they were possibly related, with poor prognosis in NBs. In our series, we found no association between methylation of BLU or other genes and survival.

Our TIMP3 methylation status results do not agree with the results of previous studies which have found little or no hypermethylation of this gene in cell lines (Yang, 2004), but our results are similar to those in tumor samples (Gonzalez-Gomez, 2003). TIMP3 has already been shown to play an important role in the carcinogenesis of many adult tumor types such as colorectal carcinomas, where its inactivation by hypermethylation has been clearly demonstrated (Brueckl, 2005; Zeng, 2001; Powe, 1997). The frequency of TIMP3 methylation is very different depending on the tumor type, varying from 70% in renal malignant tumors to 20–30% in colorectal, breast, brain and lung cancers (Esteller et al, 2001, Bachman et al, 1999), and to less than 10% in pancreatic, liver and cervical cancers (Esteller et al, 2001, Fendrich et al, 2005).

Our series seems, then, to confirm the high frequency of RASSF1A and TRAIL pathway genes methylation in neuroblastoma as well TIMP3, but we did not observe any relationship between any specific methylation and prognosis. Actually, the number of methylation genes was related to clinical stage. That may indicate an evolution of the methylation profile with the progression of the tumor.

Moreover, the NBs studied at relapse presented the same frequency of methylated genes as those at diagnosis. The two tumors studied at both moments presented the same methylations at diagnosis and at the moment of relapse. This observation indicates that the methylation of a tumor suppressor gene may eventually be used as a disease marker.

In conclusion, the results from our series and those of others may indicate that hypermethylation of tumor suppressor genes is related to neuroblastoma development and evolution. Thus, these epigenetic alterations could be used as a marker of the disease, and genes regulating methylation may be considered as possible novel therapeutic targets in neuroblastoma. Larger multicenter studies will be necessary to establish a definitive correlation between this epigenetic anomaly and the clinical findings, as well as the possibility of epigenetic follow-up by analysis of tumor DNA in the blood, which would allow a very early diagnosis of relapse.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* – Brazil, and by DDRC Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble. The authors would specially like to thank Monique Delon for her technical assistance and Dr Olivier Delattre for tumoral samples.



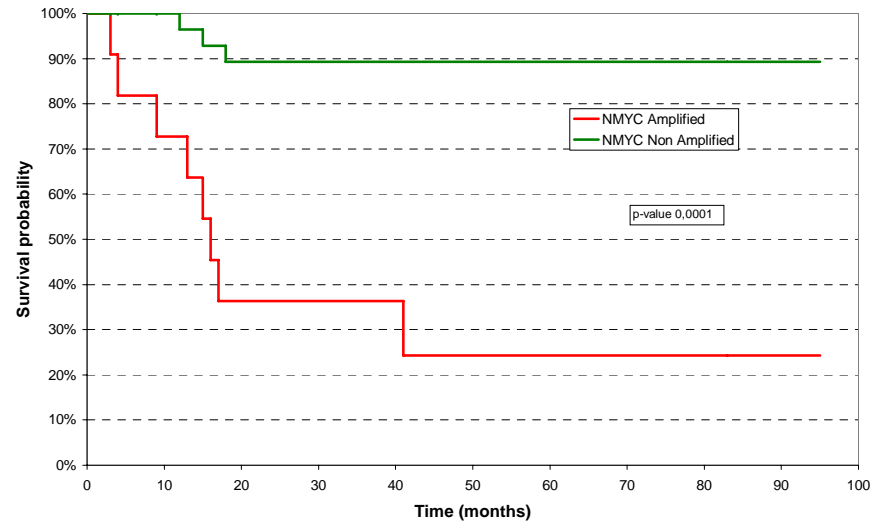
## Bibliography

1. Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, Nakagawara A, Ushijima T. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastoma. *Cancer Res* 2005; 65 (3):828-834.
2. Alaminos M, Davalos V, Cheung NKV, Gerald WL. Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1208-19.
3. Astuti D, Agathangelou A, Honorio S, Dallol A, Martinsson T, Kogner P, Cummins C, Neumann HP, Voutilainen R, Dahia P, Eng C, Maher ER, Latif F. RASSF1A promoter region CpG island hypermethylation in pheochromocytomas and neuroblastoma tumours. *Oncogene*. 2001; 20(51):7573-7.
4. Bachman KE, Herrman JG, Corn PG et al. Methylation-associated silencing of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Gene suggests a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res* 1999; 59: 798-802.
5. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; 16:168-74.
6. Banelli B, Gelvi I, Di Vinci A, Scaruffi P, Casciano I, Allemanni G, Bonassi S, Tonini GP, Romani M. Distinct CpG methylation profiles characterize different clinical groups of neuroblastic tumors. *Oncogene*. 2005; 24(36):5619-28.
7. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(3):203-16.
8. Brueckl WM, Grombach J, Wein A, Ruckert S, Porzner M, Dietmaier W, Rümmele P, Croner RS, Boxberger F, Kirchner T, Hohenberger W, Hahn EG, Jung A. Alterations in the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) are found frequently in human colorectal tumours displaying either microsatellite stability (MSS) or instability (MSI). *Cancer Letters* 2005; 223: 137-42.
9. Evans AE, Gerson J, Schnauffer L. Spontaneous regression of neuroblastoma. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1976; 44:49-54.
10. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3225-29.
11. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002; 21:5427-40.
12. Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* 2003; 4:351-8.
13. Fendrich V, Slater EP, Heinmoller E et al. Alterations of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3) gene in pancreatic adenocarcinomas. *Pancreas* 2005; 30: 40-5
14. de Fraipont F, Moro-Sibilot D, Michelland S, Brambilla E, Brambilla C, Favrot MC. Promoter methylation of genes in bronchial lavages: A marker for early diagnosis of primary and relapsing non-small cell lung cancer? *Lung Cancer* 2005; 50(2):199-209
15. Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Lomas J et al. Aberrant methylation of multiple genes in neuroblastic tumours. relationship with MYCN amplification and allelic status at 1p. *Eur J Cancer*. 2003; 39:1478-85.
16. Grill J, Avet-Loiseau H, Lellouch-Tubiana A, Sevenet N, Terrier-Lacombe MJ, Venuat AM, Doz F, Sainte-Rose C, Kalifa C, Vassal G. Comparative genomic hybridization detects specific cytogenetic abnormalities in pediatric ependymomas and choroid plexus papillomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002; 136:121-5.
17. Harada K, Toyooka S, Maitra A, Maruyama R, Toyooka KO, Timmons CF, Tomlinson GE, Mastrangelo D, Hay RJ, Minna JD, Gazdar AF. Aberrant promoter

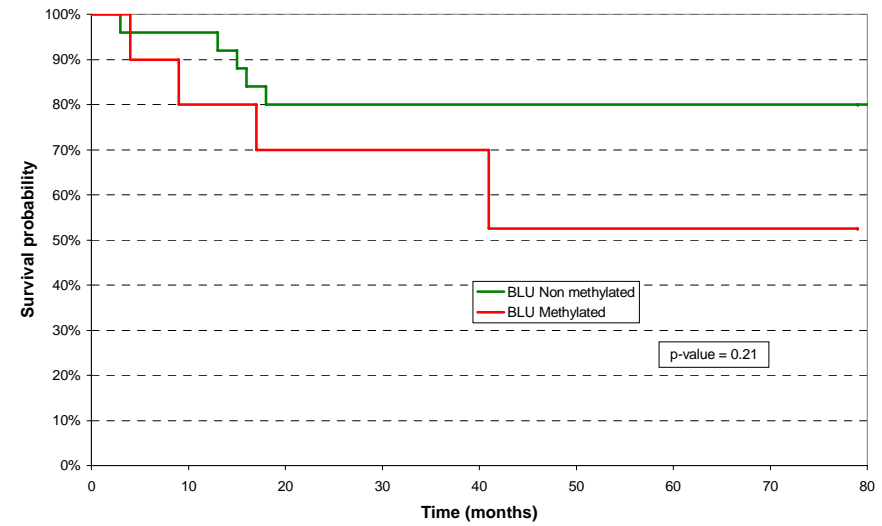
- methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines. *Oncogene*. 2002; 21(27):4345-9.
18. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*; 349:2042-54.
  19. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; 21:163-7.
  20. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3(6):415-28.
  21. Knudson AG. Chasing the cancer demon. *Annu Rev Genet* 2000; 34:1-19.
  22. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbing RB, Reynolds CP. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* 1999; 341(16):1165-73.
  23. Michalowski MB, De Fraipont F, Michelland S, Entz-Werle N, Grill J, Pasquier B, Favrot MC, Plantaz D. Methylation of RASSF1A and TRAIL pathway related genes is frequent in childhood intracranial ependymomas and benign choroid plexus papilloma. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 166: 74-81.
  24. Myohanen SK, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res* 1998; 58:591-3.
  25. Plantaz D, Vandesompele J, Van Roy N, Lastowska M, Bown N, Combaret V, Favrot MC, Delattre O, Michon J, Benard J, Hartmann O, Nicholson JC, Ross FM, Brinkschmidt C, Laureys G, Caron H, Matthay KK, Feuerstein BG, Speleman F. Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification. *Int J Cancer*. 2001; 91(5):680-6.
  26. Powe DG, Brough JL, Carter GI, Bailey EM, Stetler-Stevenson WG, Turner DR, Hewitt RE. TIMP-3 mRNA expression is regionally increased in moderately and poorly differentiated colorectal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 1997; 75: 1678-83.
  27. Schwab M. Amplification of N-myc as a prognostic marker for patients with neuroblastoma. *Semin Cancer Biol*. 1993; 4(1):13-8.
  28. Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol*. 2003;4(8):472-80.
  29. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med*. 1985; 313(18):1111-6.
  30. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, Castleberry RP. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*. 1999 Jul 15; 86(2):364-72.
  31. Song MS, Song SJ, Ayad NG, Chang JS, Lee JH, Hong HK, Lee H, Choi N, Kim J, Kim H, Kim JW, Choi EJ, Kirschner MW, Lim DS. The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. *Nat Cell Biol*. 2004 Feb;6(2):129-37.
  32. Tang XX, Robinson ME, Riceberg JS, Kim DY, Kung B, Titus TB, Hayashi S, Flake AW, Carpentieri D, Ikegaki N. Favorable neuroblastoma genes and molecular therapeutics of neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 2004 Sep 1; 10(17):5837-44.
  33. Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med*. 2000;6(5):529-35.
  34. Yang Q, Zage P, Kagan D, Tian Y, Seshadri R, Salwen HR, Liu S, Chlenski A, Cohn SL. Association of epigenetic inactivation of RASSF1A with poor outcome in human neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 15; 10(24):8493-500.
  35. van Noesel MM, van Bezouw S, Salomons GS, Voute PA, Pieters R, Baylin SB, Herman JG, Versteeg R. Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is

- associated with dense promoter hypermethylation. *Cancer Res.* 2002; 62(7):2157-61.
36. van Noesel MM, van Bezouw S, Voute PA, Herman JG, Pieters R, Versteeg R. Clustering of hypermethylated genes in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003 Nov; 38(3):226-33.
  37. Westermann F, Schwab M. Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer Lett.* 2002 Oct 28; 184(2):127-47.
  38. Zeng Z, Sun Y, Shu W, Guillem JG. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 is a basement membrane-associated protein that is significantly decreased in human colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 1290-6.

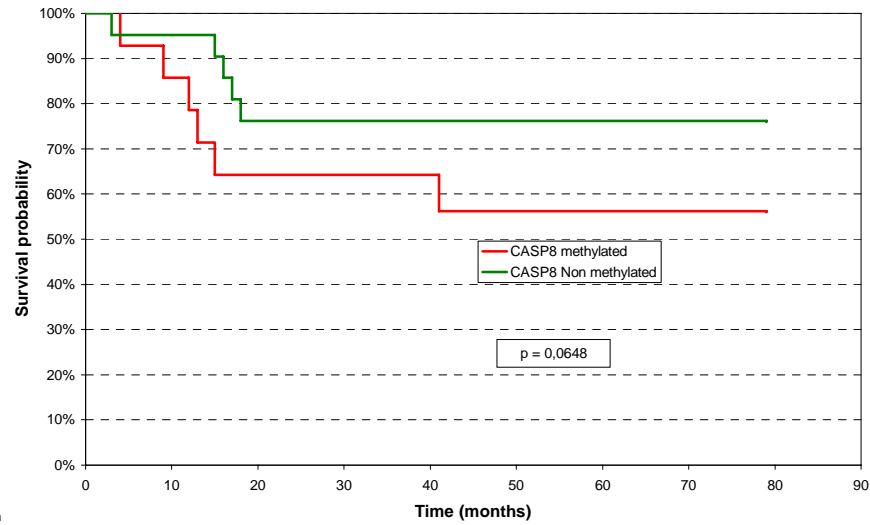
Figure 1. Kaplan-Meier survival curves for neuroblastoma patients. A. **MYCN** amplified and non-amplified NBs and survival. B. BLU methylated or unmethylated NBs and survival. C. RASSF1A methylated or unmethylated NBs and survival. D. CASP8 methylated or unmethylated NBs and survival.



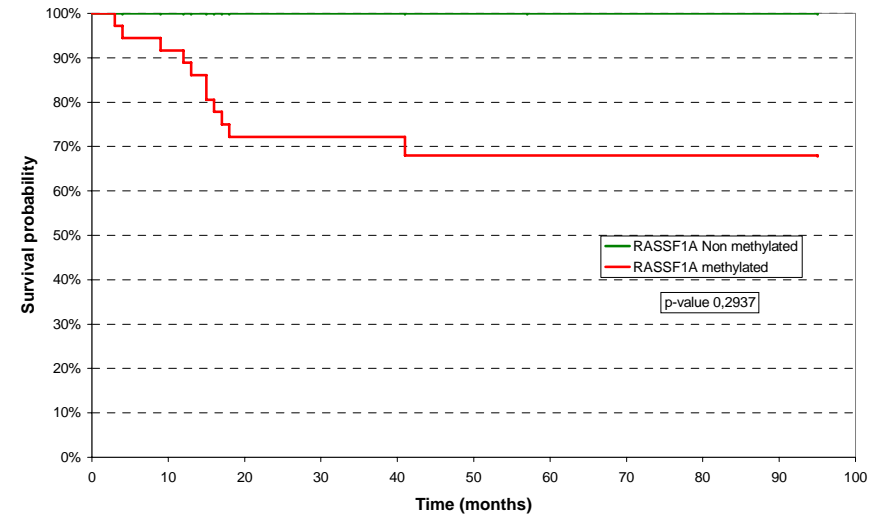
A



B.



C



D.

**Table II - Methylation status of neuroblastoma at relapse**

N°	RASSF1A	TIMP3	CASP8	DcR2	BLU	DcR1
R1		-	-	-	-	-
R2		-	-	-	-	-
R3						
R4						
R5						
R6						
R7						
R8						
R9 (NB 40)						
R10		-	1	-	1	-
R11		-	1	1	-	-
R12		-	1	-	1	-
R13		-	1	1	-	-
R14 (NB 20)		-	1	1	-	1
R15						
R16						
R17						
Total	17	10	6	5	4	3
%	100,00%	59%	35%	29%	24%	18%

- Black boxes, methylated; white boxes, non methylated

**Table I - Summary of methylation of all 19 genes, MYCN amplification and LOH 1p and 3p studies in 45 primary neuroblastoma**

Clinical data						Biological data													
N	Stage	Age (months)	Follow-up (months)	Relapse	Death	Genetics			Epigenetics										
						Mycn	del 1p	del 3p	RASSF1A	TIMP3	CASP8	DcR1	DcR2	BLU	p15	DAPK	FHIT	RAR $\beta$	Other*
NB 1	1	1	49		-	-	-	-	-	-	-	ns	ns	-	-	-	-	-	-
NB 2	1	1	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB 3	1	2	61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB 4	1	4	55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB 5	1	1	35	-	-	-	-	-	-	-	-	ns	ns	-	-	-	-	-	-
NB 6	1	5	35	-	-	-	-	-	-	-	-	ns	Ns	ns		-	-	-	-
NB 7	1	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB 8	2	23	27		-	-		-	-	-	-	-	ns	-	-	-	-	-	-
NB 9	2	16	42		-	-		-	-	-	-	-	ns	-	-	-	-	-	-
NB 10	2	9	53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB 11	2	12	69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB 12	2	5	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB 13	2	ni	ni	ni	ni	-	-	ni	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
NB 14	2	3	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ns		-	-	-	-	-
NB 15	2	4	62	-	-	-	-	-	-	-	-	ns	-	-	-	-	-	-	-
NB 16	2	17	83		-	-	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	-		-	-	-
NB 17	2	1	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ns	-	-	-	-	-	-
NB 18	2	20	39	-	-	-	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	-	-	-	-
NB 19	2	8	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB 20	3	60	70		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB 21	3	ni	ni	ni	ni	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB 22	3	21	50		-	-	-	-	-	-	-	-	-	ns	-	-	-	-	-
NB 23	3	47	4					-	-	-	-	-	-						-
NB 24	3	2	3					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB 25	3	ni	ni		ni	ni	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
NB 26	4	60	54	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-				-
NB 27	4	52	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				-
NB 28	4	41	41	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-				-
NB 29	4	9	68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
NB 30	4	47	79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
NB 31	4	20	15			-		-	-	-	-	-	ns	-	-	-	-	-	-
NB 32	4	29	12			-		-	-	-	-	-	ns	-	-	-	-	-	-
NB 33	4	40	ni	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
NB 34	4	9	15					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB 35	4	20	13					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB 36	4	20	9					-	-	-	-	ns	-	-	-	-	-	-	-
NB 37	4	5	41					-	-	-	-	ns	-	-				-	-
NB 38	4	48	72	-	-			-	-	-	-	-	-					-	-
NB 39	4	61	26	-	-			-	-	-	-	ns	-	-	-	-	-	-	-
NB 40	4	9	16					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB 41	4	33	17					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB 42	4	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB 43	4s	1	57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				-	-
NB 44	4s	4	18					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB 45	4s	7	95	-	-			-	-	-	ns	ns	ns	-	-	-	-	-	-
	Total			17	11	11	14	2	42	23	16	4	8	14	4	2	2	2	0
	%			43%	28%	26%	33%	4%	93%	51%	38%	11%	25%	34%	9%	4%	4%	4%	0%

- MYCN: gray boxes, amplified; white boxes, not amplified; ni, not informed data.
  - Del 1p and del 3p: gray boxes: present; white boxes: absent; ni: not informed
  - Relapse and death: gray boxes: yes; white boxes: no; ni: not informed data.
  - Methylation status: Black boxes, methylated; white boxes, unmethylated; NS, not studied.
- \* Other; p16INK4a, p14ARF, APC, RB1, INI1, NF2, FLIP, ECAD and MGMT

Table III. Clinical stage, MYCN amplification and CpG island hypermethylation in 45 primary neuroblastomas

Stage	No. of patients (%)	MYCN amplification	p-value	Means of methylated genes	p-value	CASP8	p-value	BLU	p-value
1	7 (15)	1	0.001	1.95	0.002	2	0.001	3	0.01
2	12 (27.5)								
4s	3 (7.5)								
3	6 (12.5)	10		3.3		14		11	
4	17 (37.5)								





### **3.4.2. Les neuroblastomes du nouveau né**

#### *I. Présentation du travail et questions posées*

Pendant la durée de ma thèse de sciences je me suis également intéressée à des problèmes cliniques ayant donné lieu à deux publications. La première concerne l'étude de tous les neuroblastomes localisés du nouveau-né traités en France entre 1990 et 1999. Elle sera décrite ici. La deuxième, qui sera mise en annexe II consiste en la description d'un cas clinique de tumeur à cellules géantes chez un jeune adolescent.

#### *II. Publication n. 4*

Neuroblastomes localisés du nouveau-né : 52 cas traités de 1990 à 1999

Mariana B. Michalowski, H. Rubie, J. Michon, S. Montamat, C. Bergeron, C. Coze, Y. Perel, D. Valteau-Couanet, J. Guitard, J.M. Guys, C. Piolat, C. Munzer, D. Plantaz.

Archives de pédiatrie 11 (2004) 782–788.

### **III. Résumé**

Le neuroblastome est la tumeur la plus fréquente en période néonatale. Il représente une entité particulière de par les circonstances de découverte (anté- ou postnatale immédiate), la possibilité bien connue de régression spontanée et la fragilité des enfants à cet âge rendant dangereuse toute intervention thérapeutique. Dans certains cas, l'évolutivité tumorale tant locorégionale (notamment vers le canal rachidien) que métastatique peut mettre en jeu le pronostic vital ou fonctionnel.

Nous avons étudié l'ensemble des cas de NB localisés, diagnostiqués en France de 1990 à 1999 et traités selon les protocoles NBL 90 et 94 de la Société Française d'Oncologie Pédiatrique (SFOP) afin d'évaluer les principales caractéristiques cliniques, radiologiques et biologiques de cette population de patients, d'apprécier et d'améliorer les résultats de la prise en charge thérapeutique proposée et d'en préciser le pronostic à court et à moyen terme.

L'âge médian au moment du diagnostic était de 12 jours (0–28) et la découverte a eu lieu dès la période anténatale chez 14 patients (27 %). Le siège de la tumeur était abdominal (n = 40, dont 20 localisations surrenaliennes), thoracique (n = 8), pelvien (n = 3), et cervical (n = 1). Une amplification de l'oncogène N-myc a été trouvée dans un cas sur les 40 évaluables. La taille de la tumeur était inférieure à 5 cm dans 25 cas, comprise entre 5 et 10 cm dans 25 cas et supérieure à 10 cm dans deux cas. Sept enfants avaient une tumeur en sablier, parmi lesquels cinq présentaient des déficits neurologiques. Un enfant est décédé d'hémorragie suite à la ponction à visée diagnostique. Trente-sept patients ont été opérés d'emblée, parmi lesquels deux sont décédés de complications postopératoires et trois ont eu une néphrectomie. Les 14 autres ont été considérés comme inopérables et ont été traités par chimiothérapie initiale et exérèse secondaire chez 12 patients. L'un d'entre eux est décédé quelques jours après le début de la chimiothérapie. Au total, 48 enfants sont vivants en rémission complète, dont quatre après une évolutivité cutanée (3) ou médullaire (1). La survie globale est de 92 % avec un recul médian de 46 mois (0–113 mois).

L'excellent pronostic des NBL justifie des indications opératoires prudentes, fondées sur des critères anatomiques et radiologiques très précis, en particulier chez le nouveau-né. Une chimiothérapie adaptée au poids, réalisée par une équipe experte, permet d'opérer certains de ces patients dans des meilleures conditions.

Mémoire original

Neuroblastomes localisés du nouveau-né : 52 cas traités de 1990 à 1999<sup>☆</sup>

Neonatal localized neuroblastoma: 52 cases treated from 1990 to 1999

M.B. Michalowski<sup>a</sup>, H. Rubie<sup>b</sup>, J. Michon<sup>c</sup>, S. Montamat<sup>c</sup>, C. Bergeron<sup>d</sup>, C. Coze<sup>e</sup>, Y. Perel<sup>f</sup>,  
D. Valteau-Couanet<sup>g</sup>, J. Guitard<sup>h</sup>, J.M. Guys<sup>i</sup>, C. Piolat<sup>j</sup>, C. Munzer<sup>b</sup>, D. Plantaz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Département de pédiatrie, hôpital Michallon, BP 217X, 38045 Grenoble cedex, France

<sup>b</sup> Unité d'hématologie-oncologie, hôpital des Enfants, 31026 Toulouse cedex 3, France

<sup>c</sup> Service de pédiatrie, institut Curie, 75231 Paris, France

<sup>d</sup> Service de pédiatrie, centre Léon-Bérard, 69008 Lyon, France

<sup>e</sup> Service d'oncologie pédiatrique, hôpital d'enfants de la Timone, 13385 Marseille cedex 05, France

<sup>f</sup> Service de pédiatrie, hôpital d'Enfants, CHU de Bordeaux, France

<sup>g</sup> Service de pédiatrie, institut Gustave-Roussy, 94805 Villejuif cedex, France

<sup>h</sup> Unité de chirurgie pédiatrique, hôpital des Enfants, 31026 Toulouse cedex 3, France

<sup>i</sup> Service de chirurgie pédiatrique, hôpital d'enfants de la Timone, 13385 Marseille cedex 05, France

<sup>j</sup> Service de chirurgie pédiatrique, hôpital Michallon, BP 217X, 38045 Grenoble cedex, France

Reçu le 21 août 2003 ; accepté le 20 janvier 2004

Disponible sur internet le 16 mars 2004

Résumé

Le neuroblastome est la tumeur la plus fréquente en période néonatale. L'objectif de cette étude a été d'analyser la présentation clinique, les modalités thérapeutiques, et l'évolution des nouveau-nés ayant présenté un neuroblastome localisé (NBL).

**Population et méthodes.** – Cinquante-deux enfants traités selon des recommandations thérapeutiques homogènes (protocoles NBL 90 et 94) entre 1990 et 1999 ont été recensés.

**Résultats.** – L'âge médian au moment du diagnostic était de 12 jours (0–28) et la découverte a eu lieu dès la période anténatale chez 14 patients (27 %). Le siège de la tumeur était abdominal ( $n = 40$ , dont 20 localisations surrenaliennes), thoracique ( $n = 8$ ), pelvien ( $n = 3$ ), et cervical ( $n = 1$ ). Une amplification de l'oncogène *N-myc* a été trouvée dans un cas sur les 40 évaluables. La taille de la tumeur était inférieure à 5 cm dans 25 cas, comprise entre 5 et 10 cm dans 25 cas et supérieure à 10 cm dans deux cas. Sept enfants avaient une tumeur en sablier, parmi lesquels cinq présentaient des déficits neurologiques. Un enfant est décédé d'hémorragie suite à la ponction à visée diagnostique. Trente-sept patients ont été opérés d'emblée, parmi lesquels deux sont décédés de complications postopératoires et trois ont eu une néphrectomie. Les 14 autres ont été considérés comme inopérables et ont été traités par chimiothérapie initiale et exérèse secondaire chez 12. L'un d'entre eux est décédé quelques jours après le début de la chimiothérapie. Au total, 48 enfants sont vivants en rémission complète, dont quatre après une évolutivité cutanée (3) ou médullaire (1). La survie globale est de 92 % avec un recul médian de 46 mois (0–113 mois).

**Conclusion.** – L'excellent pronostic des NBL justifie des indications opératoires prudentes, fondées sur des critères anatomiques et radiologiques très précis, en particulier chez le nouveau-né. Une chimiothérapie adaptée au poids, réalisée par une équipe experte, permet d'opérer certains de ces patients dans des meilleures conditions.

© 2004 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Neuroblastoma is the most frequent tumor observed in the newborn. The aim of this study was to review clinical features, treatment and outcome of newborns diagnosed with a localized neuroblastoma.

**Population and methods.** – Data from 52 cases treated according to the NBL 90 and 94 protocols between 1990 and 1999 in 18 French centers of pediatric oncology were analyzed.

<sup>☆</sup> Pour le groupe Neuroblastome de la Société française d'oncologie pédiatrique (SFOP)

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [dplantaz@chu-grenoble.fr](mailto:dplantaz@chu-grenoble.fr) (D. Plantaz).

**Results.** – The median age at diagnosis was 12 days (range 0–28) with antenatal detection in 14 patients (27%). Tumor location was abdominal in 40 patients (adrenal in 20 of the 40), thoracic in eight, pelvic in three, and cervical in one. *N-myc* amplification was observed in one out of 40 evaluable cases. The size of the primary tumor was less than 5 cm in 25 cases, between 5 and 10 cm in 25 and more than 10 cm in two. Dumbbell tumor was observed in seven, of whom five had neurological deficit. One child died from hemorrhage after fine needle biopsy during diagnostic procedure. Primary surgical resection was attempted in 37 infants, of whom two died of surgery related complications and three had nephrectomy. Tumor was deemed as unresectable in 14 patients, and primary chemotherapy was given followed by surgical excision in 12. One of them died a few days after the beginning of chemotherapy. As a whole, continuous complete remission was achieved in 48 children, four of them after relapse. Overall survival was 92% with a median follow-up of 46 months (0–113 months).

**Conclusion.** – The excellent prognosis of localized NB in neonates needs very restrictive surgical indications, with well-established anatomic and imaging criteria. Indeed, chemotherapy based on weight and managed by expert teams should allow to perform surgical excision in safer conditions for unresectable tumors.

© 2004 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

*Mots clés :* Neuroblastome ; Nouveau-né

*Keywords:* Neuroblastoma; Infant, newborn

Les tumeurs néonatales malignes sont rares, représentant de 1,7 à 2 % des tumeurs malignes de l'enfant [1–3]. Leur incidence varie selon les registres de 1/30 000 à 1/42 000 naissances vivantes [4,5]. Le neuroblastome (NB) est la tumeur la plus fréquente : il représente 45 à 68 % des tumeurs solides malignes en période néonatale [1,3,4,6–9].

La découverte d'un neuroblastome dans la période périnatale pose parfois des problèmes de diagnostic et de choix thérapeutique difficiles, voire éthique pour certains cas.

Quel que soit l'âge, le NB est dans environ la moitié des cas, une tumeur localisée, dont l'exérèse chirurgicale est le principal traitement curatif [10,11]. Dans ces formes localisées, l'exérèse complète de première intention est possible dans environ 50 % des cas, permettant d'obtenir des taux de guérison voisins de 80 % [12]. En présence de tumeurs localisées inopérables, la chimiothérapie initiale permet d'obtenir une réduction tumorale et une exérèse chirurgicale secondaire satisfaisante dans la majorité des cas, avec des taux de guérison similaires à ceux des formes opérables d'emblée [13–16]. De plus, les enfants de moins d'un an ont un pronostic très favorable lié à une plus grande fréquence de tumeurs localisées, et à des caractéristiques biologiques tumorales favorables [11,17]. Ces caractéristiques biologiques des tumeurs des nourrissons sont la rareté de l'amplification de l'oncogène *N-myc* et d'anomalies de structure dans le génome tumoral (délétion 1p, 11q et gain 17q), et au contraire la fréquence plus grande du caractère pseudotriploïde du génome tumoral, associé à des tumeurs peu agressives, voire parfois spontanément régressives [18].

Parmi les neuroblastomes survenant avant l'âge d'un an, les neuroblastomes du nouveau-né (NB-NN) représentent une entité particulière de par les circonstances de découverte (anté- ou postnatale immédiate), la possibilité bien connue de régression spontanée et la fragilité des enfants à cet âge rendant dangereuse toute intervention thérapeutique. Dans certains cas, l'évolutivité tumorale tant locorégionale (notamment vers le canal rachidien) que métastatique peut mettre en jeu le pronostic vital ou fonctionnel. Les indications

thérapeutiques doivent tenir compte de ces différents facteurs et sont du ressort d'experts multidisciplinaires.

Nous avons étudié l'ensemble des cas de NB localisés, diagnostiqués en France de 1990 à 1999 et traités selon les protocoles NBL 90 et 94 de la Société française d'oncologie pédiatrique (SFOP) afin d'évaluer les principales caractéristiques cliniques, radiologiques et biologiques de cette population de patients, d'apprécier et d'améliorer les résultats de la prise en charge thérapeutique proposée et d'en préciser le pronostic à court et à moyen terme.

## 1. Patients et méthodes

### 1.1. Patients

Tous les patients porteurs d'un neuroblastome localisé (NBL) diagnostiqué avant l'âge de 28 jours de vie et traités entre 1990 et 1999 selon les recommandations des études nationales multicentriques prospectives NBL 90 et NBL 94 de la SFOP ont été inclus dans cette étude. Les nouveau-nés présentant des neuroblastomes métastatiques d'emblée n'ont pas été inclus dans cette étude (neuroblastomes de stades IV ou IV). Le bilan diagnostique radiologique devait comporter échographie, tomodensitométrie ou IRM de la tumeur primitive et scintigraphie à la Meta Iodo Benzyl Guanidine (MIBG). Le bilan médullaire devait comporter au moins deux myélogrammes. Le diagnostic biologique reposait sur le dosage des métabolites urinaires des catécholamines (Acide homovanilique (HVA), Acide homovanilmandélique (VMA) et dopamine), complété par un dosage des LDH. Le diagnostic histologique de la tumeur primitive était indispensable, soit sur la pièce d'exérèse, soit sur une biopsie chirurgicale ou à l'aiguille dans les formes considérées comme inopérables d'emblée. Un fragment tumoral était destiné à la recherche d'une amplification de l'oncogène *N-myc*, indispensable à la décision thérapeutique. Le stade était déterminé selon les recommandations de l'*International Neuroblastoma Staging System* et la classification TNM [19].

## 1.2. Chirurgie

Des facteurs de risque opératoire avaient été définis pour l'ensemble des centres participants. Ces facteurs ont été analysés selon la topographie de la tumeur primitive lors d'une concertation entre le radiologue et le chirurgien. Une tumeur était considérée comme opérable d'emblée si l'exérèse chirurgicale pouvait être a priori complète et sans risque vital ou fonctionnel (laminectomie–laminotomie), ni sacrifice d'organe (en particulier une néphrectomie). Les tumeurs considérées comme inopérables d'emblée étaient les grosses tumeurs dépassant la ligne médiane, englobant les gros vaisseaux rétro-péritonéaux et les tumeurs, qui, du fait de leur taille, de leur structure ou de leur siège exposaient à un risque élevé de rupture ou de complication chirurgicale majeure. En outre, toutes les tumeurs en sabliers étaient considérées comme inopérables d'emblée, sauf en cas de déficit neurologique rapidement évolutif. Le stade postchirurgical était établi en fonction des données des comptes-rendus opératoire et anatomopathologique et du bilan d'imagerie postopératoire.

## 1.3. Chimiothérapie

En cas de tumeur considérée comme inopérable d'emblée, une chimiothérapie était administrée, et réalisée selon des schémas différents dans les études NBL 90 et NBL 94. Dans l'étude NBL 90, la chimiothérapie était identique quel que soit l'âge et comportait une association de carboplatine (6,6 mg/kg/jour, jours 1 à 3) et d'étoposide (5 mg/kg par jour, jours 1 à 3) (CE), avec réalisation de deux cures à 21 jours d'intervalle, suivies de deux cures de cyclophosphamide (10 mg/kg par jour, jours 1 à 5), doxorubicine (2 mg/kg, jour 5) et vincristine (0,05 mg/kg, jours 1 et 5) (CAAdO). Dans l'étude NBL 94, la chimiothérapie recommandée pour les nourrissons de moins de 12 mois était moins intensive, avec deux cures de cyclophosphamide à faibles doses (5 mg/kg par jour, jours 1 à 5) et vincristine (0,05 mg/kg, jour 1) (CO). Ces doses étaient réduites de 30 % pour les enfants de moins d'un mois. Dans l'étude NBL 94, l'association CE était recommandée, soit d'emblée pour les enfants présentant un NB en sablier symptomatique avec déficit neurologique, soit en cas de réduction tumorale insuffisante après deux cures de CO, soit en cas de caractère inopérable persistant après quatre cures.

## 1.4. Évaluation de la réponse au traitement

La réponse au traitement était établie selon les critères INRC [19] : rémission complète (CR), très bonne réponse partielle (VGPR), réponse partielle (PR), non-réponse (NR) et maladie progressive (PD).

## 1.5. Analyse statistique

Tous les neuroblastomes localisés de l'enfant âgé de moins de 28 jours pris en charge dans les centres participant

aux études NBL 90 et NBL 94 ont été analysés quel que soit le traitement réellement réalisé. Les principales caractéristiques tumorales et thérapeutiques ont été analysées et comparées à l'ensemble de la population des nourrissons âgés d'un mois à un an porteurs de neuroblastomes localisés. Les probabilités de survie globale (SG) et de survie sans événement (SSE) ont été calculées selon la méthode de Kaplan-Meier. Un événement était défini par une rechute ou un décès quelle qu'en soit la cause.

## 2. Résultats

### 2.1. Patients et présentation clinique (Tableau 1)

Au total, 52 nouveau-nés atteints de NBL ont été pris en charge dans 18 centres français d'oncologie pédiatrique entre janvier 1990 et août 1999, et ont été traités dans le cadre du protocole NBL 90 ( $n = 32$ ) ou NBL 94 ( $n = 20$ ). Pendant cette période, 617 enfants ont été traités pour un NBL, dont 293 avaient moins d'un an (47,5 %). Les NBL-NN représentent donc 18 % des NBL diagnostiqués avant l'âge d'un an. Le sex-ratio (garçon/fille) était de 1,26.

La majorité des tumeurs était de topographie abdominale (40/52 = 77 %), principalement de siège surrénalien (20/52 = 38 %). La taille de la tumeur primitive était inférieure à 5 cm dans 25 cas (48 %), comprise entre 5 et 10 cm dans 25 cas (48 %) et supérieure à 10 cm dans deux cas (4 %).

La scintigraphie MIBG était positive dans 38 des 48 cas évalués (79 %). Les catécholamines urinaires étaient supérieures aux valeurs normales dans 27 des 48 cas évalués (56 %) pour l'acide homovanilique (HVA), dans 29 sur 48 cas (60 %) pour l'acide vanilmandélique (VMA) et dans 30 sur 42 cas (71 %) pour la dopamine urinaire.

Une amplification de l'oncogène *N-myc* a été trouvée dans un seul des 40 cas étudiés (12 copies) ; 12 nouveau-nés (23 %) n'ont pas eu de détermination du statut de *N-myc*.

L'étude histopathologique a trouvé un neuroblastome dans 50 cas sur 52 (96 %) et un ganglioneuroblastome dans les deux derniers cas (4 %).

La découverte tumorale avait été faite pendant la période anténatale dans 14 cas sur 52 (27 %). Toutes les tumeurs découvertes avant la naissance étaient de siège abdominal.

Sept enfants (13 %) présentaient une tumeur en sablier avec un déficit neurologique dans cinq cas (10 % des nouveau-nés atteints de NBL (5/52)).

### 2.2. Traitement

Un enfant est décédé avant tout traitement d'un choc hémorragique suite à une biopsie à l'aiguille d'une tumeur thoracique lors de la procédure diagnostique.

Trente-sept enfants ont été considérés comme opérables d'emblée et ont bénéficié d'une exérèse de première intention (siège abdominal 32 (80 %), cervical 1 (2 %), pelvien 2 (5 %), thoracique 2 (5 %)). Parmi ces 37 cas, l'exérèse a été

Tableau 1  
Caractéristiques des patients en comparaison à l'ensemble des neuroblastomes localisés de moins d'un an dans les études NBL 90 + NBL 94

	Nouveau-nés (< 28 j)	Nourrissons < 12 mois	<i>p</i>
Patients	52	241	
Âge médian (min–max)	12 (0–28 j)	145 (≥ 28–363 j)	
Sexe M/F	29/23	138/103	NS
Siège de la tumeur			NS
Abdominale (Surrénale)	40 (20)	147	
Thoracique	8	63	
Pelvienne	3	14	
Cervicale	1	16	
Multiple	0	1	
Stade TNM			NS
T1 (< 5 cm)	25	100	
T2 (5–10 cm)	25	124	
T3 (> 10 cm)	2	17	
Catécholamines urinaires augmentées	27/48 (56 %)	136/220 (62 %)	NS
Fixation scintigraphique MIBG	38/48 (79 %)	182/218 (83 %)	NS
Amplification oncogène N-myc	1/40 (3%)	6/189 (3%)	NS
Histologie finale			NS
Neuroblastome	50	210	
Ganglioneuroblastome	2	31	
Chirurgie initiale	37	150	NS
Chimiothérapie initiale	14	91	
Décès	4	9	NS
RC2	4	21	
RC1	44	211	

RC1 : en première rémission complète.

RC2 : en deuxième rémission complète.

complète dans 25 cas (67,5 %), microscopiquement incomplète dans dix cas (27 %) et a laissé un résidu macroscopique chez deux patients (5,5 %).

Deux enfants sont décédés de complications hémorragiques postopératoires : tous les deux présentaient une tumeur de siège abdominal médian. L'un avait une tumeur mesurant 56 × 43 × 40 mm, envahissant l'artère rénale, l'aorte, la veine cave inférieure, le tronc porte, le psoas et le pilier gauche du diaphragme. Pendant l'intervention, une ischémie du rein gauche a été observée, avec une résection complète alors considérée comme impossible en peropératoire. L'analyse en biologie moléculaire de cette tumeur a montré une amplification de l'oncogène N-myc. L'autre enfant présentait une tumeur qui envahissait le tronc splénomésentérique et l'origine du tronc porte et était accolée à l'aorte englobant l'artère mésentérique supérieure, le tronc cœliaque et ses branches. La chirurgie a comporté une tumorectomie associée à une dissection de tronc cœliaque et de ses branches, une pancréatectomie isthmocaudale, une résection du tronc porte avec la ligature des veines mésentérique inférieure et splénique et la dissection du tronc cœliaque et de ses branches, mais les suites opératoires ont été fatales.

Trois enfants ont eu une néphrectomie. Tous les trois présentaient une tumeur d'une taille comprise entre 5 et 10 cm et ont eu un traitement chirurgical d'emblée.

Quatorze enfants portaient des tumeurs considérées comme inopérables d'emblée (taille importante et infiltration de la ligne médiane, des gros vaisseaux ou tumeurs en sa-

blier). Ces enfants ont bénéficié d'une chimiothérapie première par CE + CAAdO ( $n = 5$ ), CE seul ( $n = 1$ ), CO seul ( $n = 5$ ), CO + CE ( $n = 2$ ), CO + CE + CAAdO ( $n = 1$ ). La réponse à la chimiothérapie consistait en une CR dans 1 cas, une VGPR dans quatre cas, une PR dans six cas et une NR dans deux cas ce qui représente un taux de réponse de 11/13 (85 %), l'un d'entre eux était inévaluable puisque décédé au cours de la première cure de chimiothérapie (CE + CAAdO) d'une embolie pulmonaire massive. Dans un cas, la tumeur a totalement disparu sous chimiothérapie et il n'y a pas eu d'intervention chirurgicale (CR). Les 12 autres cas ont fait l'objet d'une exérèse chirurgicale secondaire. L'exérèse après chimiothérapie a été macroscopiquement complète dans les 12 cas. Le délai médian entre le moment du diagnostic et l'intervention chirurgicale chez ces malades était de 93 jours (extrêmes de 63 jours à 427 jours). Il n'y a pas eu de décès directement imputable à la chimiothérapie chez ces 14 nouveau-nés inopérables d'emblée.

Toutes les tumeurs surrénaliennes kystiques ont bénéficié d'une résection complète d'emblée.

Un neuroblastome en sablier a été observé chez sept enfants, dont cinq avec des symptômes neurologiques (paraparésie, troubles sphinctériens). La localisation de la tumeur était abdominale dans trois cas (43 %), thoracique dans trois cas (43 %) et pelvienne dans un cas (14 %). Tous les enfants ont été traités initialement par chimiothérapie et un enfant a eu une hémilaminectomie. Quatre enfants, atteints de paraplégie néonatale ont gardé des séquelles neurologiques.

Au total, 48 enfants étaient en première rémission complète ou en très bonne rémission partielle à la fin du traitement.

### 2.3. Évolution

Trois patients ont présenté une localisation cutanée ( $n = 2$ ) et médullaire ( $n = 1$ ), trois mois après le traitement initial (exclusivement chirurgical). Ces trois patients ont reçu une chimiothérapie lors de la récurrence et ont guéri. Un quatrième patient a présenté une récurrence locale 13 mois après la résection complète d'un neuroblastome en sablier et a été traité avec succès par une deuxième ligne de traitement. Aucun enfant n'est décédé de progression tumorale. Dans l'ensemble de la cohorte, la survie globale a été de 92 % et la survie sans événement de 83,3 % avec un suivi médian de 46 mois (extrêmes de 0 à 113 mois).

### 3. Discussion

Le neuroblastome est la plus fréquente des tumeurs malignes néonatales [1,3,4,7,20,21]. Actuellement, l'échographie prénatale peut amener à suspecter le diagnostic de neuroblastome. Plus fréquemment, c'est après la naissance que sont découverts les neuroblastomes de la période néonatale, le plus souvent au niveau de l'abdomen lors de la palpation d'une masse, plus rarement sur des signes de compressions neurologiques ou respiratoires. Le neuroblastome est le principal diagnostic à envisager devant une masse suprarénale détectée en période périnatale, représentant 43 % des étiologies des masses suprarénales dans une étude réalisée en région parisienne en période périnatale [6]. Les principaux diagnostics différentiels sont l'hématome de la surrenale, la séquestration pulmonaire sous-diaphragmatique et des anomalies rénales incluant le néphrome mésoblastique. Le NB se présente comme une masse solide ou souvent partiellement kystique, avec des foyers de calcification [22].

Dans notre série, le diagnostic a été très précoce (médiane 12 jours) et la plupart des tumeurs était localisée dans l'abdomen, principalement au niveau de la glande surrenale. La découverte de la tumeur avait été faite pendant la période anténatale dans 14 cas sur 52 (27 %) et tous les cas diagnostiqués avant la naissance étaient de siège abdominal. Les données de la littérature vont dans ce sens, l'âge médian au moment du diagnostic allant de dix à 13 jours selon les séries [2,7–9,23] et le siège étant abdominal dans 60 à 100 % des cas [2,23,24], avec une prépondérance des tumeurs de stade I. Ceci est en accord avec l'hypothèse d'un fréquent retard de la maturation surrenalienne, où des foyers de cellules neuroblastiques peuvent persister jusqu'à la naissance. En effet, les autopsies de nouveau-nés ont permis de détecter un neuroblastome « in situ » 200 fois plus souvent que cliniquement après la naissance, semblant confirmer l'hypothèse de régression-maturation [25]. De même, l'échographie anténatale pourrait détecter chez certains fœtus une masse qui

correspondrait plus à un phénomène de maturation retardée, donc davantage à une variante du processus normal qu'à un véritable phénomène tumoral [26]. De même, les neuroblastomes de type I de la classification clinicobiologique de Brodeur et al. [19] (stade localisé, absence d'amplification de *N-myc* et génome triploïde) sont considérés comme des tumeurs issues d'un phénomène d'apoptose « retardée » des cellules neuroblastiques [27]. Il faut d'ailleurs rappeler que les études de dépistages du neuroblastome pendant la première année de vie ont conduit à des diagnostics par excès avec une incidence du neuroblastome qui a pratiquement doublé par rapport à une population non dépistée ; des neuroblastomes voués à une régression spontanée ont été découverts par le dépistage, alors que le dépistage n'a permis ni de diminuer l'incidence des formes plus tardives, métastatiques et de mauvais pronostic, ni d'en améliorer la survie [28,29]. Dans cette série de neuroblastomes diagnostiqués au cours du premier mois de vie, aucun patient n'est décédé d'une évolutivité tumorale, confirmant l'excellent pronostic comme cela a été rapporté dans la littérature, avec une survie globale supérieure à 90 % [13,15]. Les échecs sont liés à des complications de compression de la tumeur avant traitement dans un cas, et de complications lors du bilan diagnostique (un cas) ou de complications chirurgicales (deux cas), ce qui illustre la grande fragilité des nouveau-nés. À l'inverse, les neuroblastomes n'ont que très rarement à cet âge des caractéristiques biologiques défavorables, ce qui permet d'obtenir le plus souvent la guérison par la simple exérèse chirurgicale, lorsque celle-ci est possible sans risque. Comme dans la littérature, la chirurgie a une place majeure puisque 70 % de ces nouveau-nés ont été opérés de première intention. Les deux complications chirurgicales létales et les trois cas de néphrectomie soulèvent bien le problème de l'indication opératoire initiale, particulièrement cruciale à cet âge. S'il est difficile de proposer une chimiothérapie à des nouveau-nés, l'absence de complications imputables à ce type de traitement chez les 14 enfants considérés comme inopérables, illustre la faisabilité de ce traitement dans des conditions de posologie et de surveillance adaptées à l'âge et au poids, et réalisée au sein d'une équipe expérimentée. Cette chimiothérapie préopératoire se justifie parfaitement dès lors que le bilan d'opérabilité du neuroblastome a évoqué un risque vital ou fonctionnel de l'exérèse de la tumeur en première intention, en fonction des critères d'opérabilité définis indépendamment de l'âge. Certains ont pu proposer la surveillance attentive pour les neuroblastomes des nourrissons les plus jeunes, soit devant une petite tumeur, soit face à une tumeur inopérable mais dénuée de menace vitale ou fonctionnelle, dans l'espoir d'une régression spontanée [30].

Un autre problème pour ces tumeurs de bon pronostic vital est celui des compressions spinales ou radiculaires de diagnostic périnatal : les neuroblastomes en sablier représentent 7 à 15 % des neuroblastomes et touchent préférentiellement le nourrisson [31,32]. Cette complication peut se voir dès la naissance, avec les déficits neurologiques moteurs et sphinctériens de toute compression médullaire grave. En outre, le



diagnostic chez un nouveau-né peut être difficile devant une hypomobilité des membres inférieurs sans début aigu, d'autant que le phénomène de compression peut avoir commencé dans la période anténatale [33]. Le pronostic neurologique des neuroblastomes en sablier du nouveau-né semble plus défavorable que chez l'enfant plus grand [32,33]. Le risque de complications rachidiennes tardives après laminectomie et l'efficacité habituelle de la chimiothérapie doivent faire considérer ces tumeurs comme inopérables d'emblée, et ce, en accord avec les neurochirurgiens [34,35]. Si cette approche a été privilégiée pour les sept nouveau-nés porteurs d'une tumeur en sablier, quatre d'entre eux ont gardé des séquelles neurologiques, confirmant le moins bon pronostic neurologique à cet âge.

#### 4. Conclusion

Notre étude a confirmé le bon pronostic des neuroblastomes de la période néonatale. Les choix thérapeutiques doivent se faire dans le respect strict des critères d'opérabilité des neuroblastomes localisés : les tumeurs opérables d'emblée sont souvent guéries par exérèse exclusive ; les tumeurs d'emblée inopérables, moins fréquentes, mais essentielles à identifier doivent bénéficier d'une chimiothérapie préopératoire selon les modalités adaptées à l'âge et en étroite collaboration entre les pédiatres oncologues et les néonatalogues. Une autre possibilité est de proposer, en l'absence de menace fonctionnelle immédiate, la surveillance simple d'une tumeur inopérable, dans l'espoir d'une régression spontanée. Cette attitude devrait permettre de minimiser le risque iatrogénique, qui reste un problème important à cet âge. Le risque fonctionnel neurologique des rares compressions médullaires anténatales ou prolongées reste malheureusement élevé. Enfin, certaines tumeurs de découverte anténatale peuvent aussi faire éventuellement l'objet d'une simple surveillance rapprochée, la régression spontanée au cours des premiers mois pouvant permettre d'éviter tout traitement. Toute suspicion de neuroblastome, en particulier la découverte d'une masse suprarénale en période anténatale, doit être accompagnée d'une information complète et objective des futurs parents faisant état de la démarche diagnostique, de l'excellent pronostic de cette tumeur et des diverses modalités thérapeutiques incluant la possibilité d'une simple surveillance.

#### Références

- [1] Campbell AN, Chan HS, O'Brien A, Smith CR, Becker LE. Malignant tumours in the neonate. *Arch Dis Child* 1987;62:19–23.
- [2] Cecchetto G, Previtiera C, Messineo A, Longo M, Guglielmi M. Neonatal malignant solid tumors. *Tumori* 1990;76:81–3.
- [3] Teinturier C, Kalifa C, Hartmann O, Flamant F, Lemerle J. Tumeurs solides malignes néonatales. À propos de 75 cas. *Arch Fr Pédiatr* 1992;49:187–92.
- [4] Bader JL, Miller RW. US cancer incidence and mortality in the first year of life. *Am J Dis Child* 1979;133:157–9.
- [5] Borch K, Jacobsen T, Olsen JH, Hirsch F, Hertz H. Neonatal cancer in Denmark 1943–1985. *Pediatric Hematol Oncol* 1992;9:209–16.
- [6] Sauvat F, Sarnacki S, Brisse H, Medioni J, Rubie H, Aigrain Y, et al. Outcome of suprarenal localized masses diagnosed during the perinatal period. A retrospective multicenter study. *Cancer* 2002;94:2474–80.
- [7] Crom DB, Wilimas JA, Green AA, Pratt CB, Jenkins 3rd JJ, Behm FG. Malignancy in the neonate. *Med Pediatr Oncol* 1989;17:101–4.
- [8] Gale GB, D'Angio GJ, Uri A, Chatten J, Koop CE. Cancer in neonates: the experience at the Children's Hospital of Philadelphia. *Pediatrics* 1982;70:409–13.
- [9] Isaacs Jr H. Congenital and neonatal malignant tumors. A 28-year experience at Children's Hospital of Los Angeles. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1987;9:121–9.
- [10] De Bernardi B, Conte M, Mancini A, Donfrancesco A, Alvisi P, Toma P, et al. Localized resectable neuroblastoma: results of the second study of the Italian Cooperative Group for Neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1995;13:884–93.
- [11] Le Tourneau JN, Bernard JL, Hendren WH, Carcassonne M. Evaluation of the role of surgery in 130 patients with neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 1985;20:244–9.
- [12] Haase GM, Wong KY, de Lorimier AA, Sather HN, Hammond GD. Improvement in survival after excision of primary tumor in Stage III neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 1989;24:194–200.
- [13] Tsuchida Y, Ikeda H, Iehara T, Toyoda Y, Kawa K, Fukuzawa M. Neonatal neuroblastoma: incidence and clinical outcome. *Med Pediatr Oncol* 2003;40:391–3.
- [14] Garaventa A, De Bernardi B, Pianca C, Donfrancesco A, Cordero di Montezemolo L, Di Tullio MT, et al. Localized but unresectable neuroblastoma: treatment and outcome of 145 cases. *J Clin Oncol* 1993;11:1770–9 Italian Cooperative Group of Neuroblastoma.
- [15] Rubie H, Plantaz D, Coze C, Michon J, Frappaz D, Baranzelli MC, et al. Localised and unresectable neuroblastoma in infants: excellent outcome with primary chemotherapy. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:247–50 Neuroblastoma Study Group, Société Française d'Oncologie.
- [16] West DC, Shamberger RC, Macklis RM, Kozakewich HP, Wayne AS, Kreissman SG, et al. Stage III neuroblastoma over 1 year at diagnosis: improved survival with intensive multimodality therapy including multiple alkylating agents. *J Clin Oncol* 1993;11:84–90.
- [17] Rosen EM, Cassady JR, Kretschmar C, Frantz N, Levey R, Sallan SE. Influence of local-regional lymph node metastases on prognosis in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 1984;12:260–3.
- [18] Rubie H, Hartmann O, Michon J, Frappaz D, Coze C, Chastagner P, et al. *N-myc* gene amplification is a major prognostic factor in localized neuroblastoma: results of the French NBL 90 study. *J Clin Oncol* 1997;15:1171–82 Neuroblastoma Study Group of the Société Française d'Oncologie Pédiatrique.
- [19] Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castellberry RP, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment. *J Clin Oncol* 1993;11:1466–77.
- [20] Parkes SE, Muir KR, Southern L, Cameron AH, Darbyshire PJ, Stevens MC. Neonatal tumours: a thirty-year population based study. *Med Pediatr Oncol* 1994;22:309–17.
- [21] Granata C, Fagnani AM, Gambini C, Boglino C, Bagnulo S, Cecchetto G, et al. Features and Outcome of neuroblastoma detected before birth. *J Pediatr Surg* 2000;35:88–91.
- [22] Sbragia L, Paek BW, Feldstein VA, Farrel JA, Harrison MR, Albanese CT, et al. Outcome of prenatally diagnosed solid fetal tumors. *J Pediatr Surg* 2001;36:1244–7.
- [23] Moppett J, Haddadin I, Foot AB. Neonatal neuroblastoma. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999;81:F134–7.

- [24] Kawakami T, Monobe Y, Monforte H, Woods WG, Tuchman M, Lemieux B, et al. Pathology review of screening negative neuroblastomas: a report from the Quebec Neuroblastoma Screening Project. *Cancer* 1998;83:575–81.
- [25] Beckwith JB, Martin RF. Observations on the histopathology theory of neuroblastomas. *J Pediatr Surg* 1968;3:106–10.
- [26] Turkel SB, Hitabashi HH. The natural history of neuroblastic cells in fetal adrenal gland. *Am J Pathol* 1974;76:225–44.
- [27] Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1999;17:2264–79.
- [28] Yamamoto K, Hanada R, Kikuchi A, Ichikawa M, Aihara T, Oguma E, et al. Spontaneous regression of localized neuroblastoma detected by mass screening. *J Clin Oncol* 1998;16:1265–9.
- [29] Woods WG, Tuchman M, Robinson LL, Bernstein M, Leclerc JM, Brisson LC, et al. A population-based study of the usefulness of screening for neuroblastoma. *Lancet* 1996;348:1682–7.
- [30] Bessho F. Effects of mass screening on age-specific incidence of neuroblastoma. *Int J Cancer* 1996;67:520–2.
- [31] Plantaz D, Hartmann O, Kalifa C, Sainte-Rose C, Lemoine G, Lemerle J. Localized dumbbell neuroblastoma: a study of 25 cases treated between 1982 and 1987 using the same protocol. *Med Pediatr Oncol* 1993;21:249–53.
- [32] Plantaz D, Rubie H, Michon J, Mechinaud F, Coze C, Chastagner P, et al. The treatment of neuroblastoma with intraspinal extension with chemotherapy followed by surgical removal of residual disease. A prospective study of 42 patients — results of the NBL 90 Study of the French Society of Pediatric Oncology. *Cancer* 1996;78:311–9.
- [33] Munro FD, Carachi R, Fyfe AH. Congenital neuroblastoma presenting with paraplegia. *Arch Dis Child* 1991;66:1246–7.
- [34] Katzenstein HM, Kent PM, London WB, Cohn SL. Treatment and outcome of 83 children with intraspinal neuroblastoma: the Pediatric Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 2001;19:047–55.
- [35] Hoover M, Bowman LC, Crawford SE, Stack C, Donaldson JS, Grayhack JJ, et al. Long-term outcome of patients with intraspinal neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 1999;32:353–9.



### 3.5. CONCLUSION

Nous avons réussi à établir un profil de méthylation caractéristique des neuroblastomes. Nous avons observé, comme pour les épendymomes, que certains gènes très souvent méthylés dans les cancers des adultes ne l'étaient pas dans les neuroblastomes (par exemple, p16). Ainsi, il semble qu'un profil spécifique existe dans les cancers de l'enfant. Notre cohorte semble représentative avec des stades, une amplification de NMYC et une délétion de 1p présentant la fréquence retrouvée dans la littérature et nous avons pu confirmer leur liaison avec le pronostic.

Récemment, différents profils des neuroblastomes ont été décrits. Banelli et al. (2005) ont observé deux groupes de gènes méthylés dans les cellules neuroblastiques. Le premier groupe inclut les gènes fréquemment méthylés chez les adultes mais qui ne l'étaient jamais dans les neuroblastomes (p16, MGMT et RAR $\beta$ ), et un deuxième groupe des gènes qui sont méthylés d'une façon caractéristique dans les neuroblastomes (84% RASSF1 et 42% DCR2). Nos résultats sont concordants.

Dans notre étude sur les neuroblastomes, 96% (43/45) avaient au moins un gène méthylé. Cette fréquence élevée de méthylation est due surtout à la méthylation du gène RASSF1A, qui a été observée dans 93% des tumeurs primitives et dans 100% des rechutes. Ces résultats correspondent à ceux des études qui ont retrouvé la méthylation de RASSF1A dans 100% des lignées cellulaires et dans 50 à 90% des tumeurs (Harada, 2002; Astudi, 2001; Alaminos, 2004; Banelli, 2005). Dans notre série nous n'avons pas retrouvé de relation statistiquement significative entre la méthylation de RASSF1A et le pronostic, mais les seules tumeurs qui ne la présentaient pas étaient des neuroblastomes de très bon pronostic : deux tumeurs de stade 1 chez des enfants de moins d'un an et un stade 4s qui ont eu une évolution favorable. Une tumeur de stade 1 a présenté une récurrence mais pas d'évolution tumorale suite au traitement. L'absence de méthylation de RASSF1A semble donc définir un sous-groupe biologique de tumeurs avec un très bon pronostic.

Nous avons aussi trouvé une corrélation entre le stade clinique et le nombre des méthylations, ce qui est en accord avec l'idée de différentes pathologies regroupées sous le terme « neuroblastome ». Les stades de bon pronostic ont peu d'anomalies génétiques et épigénétiques

alors que les maladies agressives avec amplification de NMYC ont plusieurs de gènes hyperméthylés.

En conclusion, les résultats de notre série sont en accord avec ceux de la littérature et indiquent clairement que l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs est impliquée dans le développement et l'évolution des neuroblastomes, et pourrait éventuellement être utilisée en association avec d'autres méthodes de classification biologique et comme marqueurs de la maladie pour permettre une meilleure définition des groupes à risque. Il reste aussi la possibilité que la méthylation de GST soit une nouvelle cible thérapeutique dans ces tumeurs.

# CHAPITRE 3.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

Récemment plusieurs études ont publié des profils de méthylation spécifiques des certaines tumeurs de l'adulte, mais les observations sur les tumeurs des enfants sont rares. Les résultats rapportés dans ce manuscrit représentent une aide importante dans la compréhension du rôle de la méthylation dans deux groupes de tumeurs de l'enfant: les épendymomes et les neuroblastomes. En effet, nous avons mis en évidence que ces tumeurs présentent régulièrement des méthylations de certains gènes, ce que peut suggérer la présence d'un profil de méthylation spécifique à ces tumeurs (publication n° 1 et 3). Nous avons, en outre, montré que la méthylation des gènes liés à l'apoptose est aussi présente dans un groupe de tumeurs bénignes (papillome du plexus choroïde) mais pas dans les tissus normaux suggérant son rôle dans une étape initiale de la tumorigenèse. Enfin, nous avons montré que le nombre des méthylations est lié au stade clinique des neuroblastomes. L'ensemble de ces résultats démontre que la méthylation a un rôle dans l'évolution de ces tumeurs.

Des efforts sont actuellement réalisés pour découvrir des gènes pour lesquels la méthylation est spécifique du tissu tumoral. Dans ce but, des études avec des contrôles normaux et avec un grand nombre de cas sont nécessaires. Pour faciliter l'analyse de ces cas, des techniques sensibles, peu coûteuses et rapides doivent être développées. De plus, les échantillons disponibles sont souvent de petites biopsies. C'est pour ces raisons qu'actuellement la MSP est la technique la plus largement utilisée et associée à des résultats intéressants dans plusieurs groupes de tumeurs. Elle ne nécessite qu'une faible quantité d'ADN et, vu sa grande sensibilité, elle est capable de détecter de l'ADN tumoral même s'il est mélangé dans une grande quantité d'ADN normal. Elle semble être la technique idéale pour tracer un profil de méthylation dans des

grandes séries de tumeurs et aussi pour un éventuel suivi épigénétique d'un malade pour lequel le profil de méthylation est connu.

D'autres méthodes peuvent également être envisagées pour remplacer la MSP dans cette recherche. Les puces à ADN sont de plus en plus utilisées. L'augmentation de leur utilisation dans la recherche des méthylation permettra certainement une analyse rapide d'un grand nombre de gènes. Ces puces restent actuellement une méthode plus chère et moins sensible que la MSP.

L'intérêt de la description d'un profil de méthylation pour une tumeur donnée réside surtout dans le fait que nous pouvons l'utiliser comme marqueur de la maladie, par exemple pour le diagnostic précoce des populations à risque, pour la stratification de l'agressivité tumorale et la détection précoce d'une rechute. Plus particulièrement dans les cancers de l'enfant, cette étude pourrait nous éviter d'autres méthodes invasives, irradiantes et parfois douloureuses. Dans le cas où le profil de méthylation d'un neuroblastome donné est connu, nous pourrions chercher cette méthylation dans le sang régulièrement et, éventuellement, diagnostiquer une rechute biologique avant même d'avoir une rechute tumorale mesurable radiologiquement. Dans le cas des épéndymomes, l'ADN tumoral pourrait être cherché dans le liquide céphalorachidien, en complément des imageries.

Dans les cancers de l'adulte, la détection précoce de la maladie résulte très souvent en une meilleure évolution clinique. C'est pour cette raison que beaucoup d'efforts sont actuellement mis dans le développement des nouvelles stratégies de diagnostic. Pour beaucoup de ces tumeurs solides, les symptômes n'apparaissent qu'après la dissémination de la tumeur primitive. La palpation directe, la détection visuelle et la biopsie sont généralement limitées à des parties accessibles du corps, d'où l'intérêt d'un marqueur disponible dans les tissus ou les liquides biologiques. La méthylation de l'ADN semble avoir lieu précocement au cours de la carcinogenèse et semble donc être un indicateur précoce de l'existence de la maladie ou du risque de développer une tumeur. Afin de le valider comme un marqueur biologique et sachant qu'il apparaît avant toute autre manifestation clinique, des études prospectives doivent être menées. En fait, des études récentes indiquent qu'il peut être possible de prédire d'une façon plus précise l'évolution clinique d'un patient si nous évaluons les caractéristiques moléculaires de la tumeur de cette personne.

A ce jour dans notre laboratoire, des études sont en cours sur les cancers du poumon et de la tête et cou avec l'analyse systématique du profil de méthylation de la tumeur, suivie par une recherche systématique de ces anomalies dans le sang, les lavages broncho alvéolaires et la

salive. Des résultats intéressants commencent à être observés avec une relation possible entre la réapparition de ces altérations dans les liquides analysés et la rechute clinique.

L'autre intérêt peut être le diagnostic différentiel. Dans le cas où le doute se pose entre deux tumeurs de la même localisation, par exemple entre un ostéosarcome et un sarcome d'Ewing, dans le cas où les profils de méthylation sont distincts, l'analyse de l'ADN tumoral circulant pourrait nous donner une indication rapide pour le diagnostic et servir plus tard à la surveillance de ce patient.

Enfin, par rapport à la poursuite de l'étude de la méthylation dans les cancers de l'enfant, des séries larges d'échantillons des tumeurs de l'enfance doivent être permises grâce à une collaboration de plusieurs centres, vu la rareté de ces tumeurs, pour permettre de caractériser des relations plus précises entre la clinique et les altérations épigénétiques. D'autres études doivent aussi être menées avec d'autres types histologiques de tumeurs de l'enfant pour voir si la méthylation de RASSF1A, si fréquente dans nos deux groupes de tumeurs, est retrouvée dans les d'autres cancers de l'enfant. Il peut être aussi intéressant de passer à d'autres techniques pour analyser la localisation de la méthylation d'un gène donné dans chaque groupe de tumeur. Tous ces résultats pourraient être utilisés dans le diagnostic précoce aussi bien que dans le suivi régulier de nos patients.

La deuxième utilité de la découverte de la méthylation a été l'ouverture d'une nouvelle voie thérapeutique. Des agents déméthylants ont commencé à être utilisés dans des études cliniques et semblent avoir des résultats intéressants, surtout dans les leucémies. Vu la fréquence élevée de la méthylation dans les deux groupes de tumeurs étudiées, surtout du gène RASSF1A, les agents déméthylants pourraient être intéressants dans ces tumeurs. Il faut cependant rappeler que les résultats de l'utilisation isolée de ces médicaments dans les tumeurs solides des adultes n'est pas très encourageante. Connaissant les différences histologiques, de comportement et de profil épigénétique entre les cancers des adultes et ceux des enfants les résultats obtenus avec ces derniers peuvent être éventuellement différents. Il faudra cependant évaluer les possibles effets indésirables qui pourront être observés à court et à long terme avec l'utilisation des agents déméthylants dans un organisme encore en train d'évoluer.

L'étude de la méthylation des GST peut aussi nous aider dans le choix thérapeutique. Quelques gènes ont été initialement étudiés pour leur rôle potentiel dans l'évolution clinique. Nous pouvons citer, par exemple, E-cadherine et sa participation dans l'adhésion cellulaire et les métastases. D'autres gènes étudiés régulent les réponses à la chimiothérapie tels que RAR  $\beta$  et



MGMT. Le dernier a été décrit dans le cas des gliomes traités par carmustine (un agent alkylant) (Esteller, 2000a). La méthylation de MGMT entraînait une sensibilisation de la tumeur aux agents alkylants, ce qui est compréhensible vu le rôle réparateur de MGMT. La pharmacogénomique reste encore un point intéressant à étudier plus en détails dans d'autres études.

Notre étude permet donc d'associer la méthylation des gènes suppresseurs à la tumorigenèse des cancers de l'enfant et ouvre les portes à plusieurs autres études biologiques et cliniques.

Mon intention est de poursuivre mes activités cliniques et de recherche en retournant au Brésil. Tout d'abord mettre en place des collaborations avec des groupes d'autres villes et établir un réseau de collectes de données cliniques et biologiques et des banques de tumeurs pour permettre des études à long terme. Actuellement dans mon pays, les traitements des cancers de l'enfance ne sont pas homogènes, chaque service utilisant un protocole différent (européen ou américain, et parfois brésilien). Il serait intéressant de mettre en place des groupes de recherche qui sont disposés à soigner les enfants de la même façon pour permettre des études de plus grande envergure. Deuxièmement, j'aimerais poursuivre la relation avec la France en établissant un projet de coopération entre le service où je serais et les institutions françaises. Ce qui permettra aussi à d'autres étudiants de vivre la même expérience que j'ai vécue et d'améliorer la recherche dans mon pays. Les chercheurs français, à leur tour, participeront à des publications et pourront aussi venir au Brésil régulièrement pour visiter les services et discuter largement des projets. Troisièmement, je voudrais poursuivre ma formation clinique et de recherche en réalisant dans les années qui suivront soit un post-doctorat soit un « fellowship » dans d'autres pays.





# REFERENCES

## BIBLIOGRAPHIQUES

---

Adams, J. M. and Cory, S. (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." Science 281: 1322-26.

Adorjan, P., J. Distler, E. Lipscher et al. (2002) "Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis." Nucleic Acids Res 30:e21.

Agathangelou, A., S. Honorio, D. P. Macartney, et al. (2001) "Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours" Oncogene 20 : 1509–18

Agathangelou A., A. Dallol et al. (2003) "Epigenetic inactivation of the candidate 3p21.3 suppressor gene BLU in human cancers" Oncogene 22 :1580–8.

Agathangelou, A., W.N. Cooper, F. Latit. (2005) "Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers." Cancer Res 65: 3497–508.

Agirre, X., J.L. Vizmanos, M.J. Calasanz, et al. (2003) "Methylation of CpG dinucleotides and/or CCWGG motifs at the promoter of TP53 correlates with decreased gene expression in a subset of acute lymphoblastic leukemia patients." Oncogene 22:1070– 2.

Alaminos, M., V. Davalos, N.K.V. Cheung, W.L. Gerald (2004). "Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma." J Natl Cancer Inst 96: 1208-19.

Alonso M.E., M.J. Bello, P. Gonzalez-Gomez et al. (2003) "Aberrant promoter methylation of multiple genes in oligodendrogliomas and ependymomas." Cancer Genet Cytogenet 144: 134–42.

Alonso M.E., M.J. Bello, P. Gonzalez-Gomez et al. (2004) "Aberrant CpG island methylation of multiple genes in ependymal tumors." J Neurooncol 67:159-65.

Arapshian, A., Y. S. Kuppumbatti, R. Mira-y-Lopez (2000) "Methylation of conserved CpG site neighboring the beta retinoic acid response element may mediate retinoic acid receptor beta gene silencing in MCF-7 breast cancer cells." Oncogene 19: 4066–70.

Ashkenazi, A. and V. M. Dixit. (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science 281:1305-8.

Ashok N. R., W. W. Jiang et al. (2003) "Death-Associated Protein Kinase Promoter Hypermethylation in Normal Human Lymphocytes" Cancer Res 63: 7694-8.

Astuti, D., A. Agathangelou, S. Honorio et al. (2001) "RASSF1A promoter region CpG island hypermethylation in pheochromocytomas and neuroblastoma tumours" Oncogene 20:7573–7.

Attardi, L. D., E. E. Reczek, C. Cosmas, et al. (2000). "PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family." Genes Dev. 14: 704-18.

Bachman, K.E., J.G. Herman, P.G. Corn et al.(1999) "Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase- 3 gene suggests a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers." Cancer Res 59:798–802.

Bachman, K.E., M.R. Rountree, S.B. Baylin. (2001) "Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin." J Biol Chem 276:32282-7.

Balint, E. E. and K. H. Vousden (2001). "Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein." Br. J. Cancer 85: 1813-23.

Baylin, S. B. and J. G. Herman. (2000) "DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics." Trends Genet 16: 168-74.

Baker, N. and H. Clevers. (2000) "Catenins, Wnt signaling and cancer." Bioassays 22: 961-5.

Balana, C., J.L. Ramirez, M. Taron et al. (2003) "O6-methyl-guanine-DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme." Clin Cancer Res 9:1461-8.

Banelli, B.,A. Di Vinci, I. Gelvi et al. (2005) "DNA methylation in neuroblastic tumors." Cancer Lett 228:37-41.

Barghorn, A., E.J. Speel, B. Farspour et al. (2001) "Putative tumor suppressor loci at 6q22 and 6q23-q24 are involved in the malignant progression of sporadic endocrine pancreatic tumors." Am J Pathol 158:1903–11.

Barlow, D.P. (1995) "Gametic imprinting in mammals." Science 270:1610-3.

Beckwith, J.B. (1998) "Children at increase risk for Wilms tumor: monitoring issues." J Pediatr 132: 377-9.

Bello, M.J., J.M. De Campos, A. Isla et al (2006). "Promoter CpG methylation of multiple genes in pituitary adenomas: frequent involvement of caspase-8." Oncol Rep 15:443-8.

Bender, C.M., M.M. Pao, P.A. Jones. (1998) "Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines." Cancer Res 58: 95-101.

Bennett, M., K. Macdonald, S. W. Chan, et al. (1998). "Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis." Science 282: 290-3.

Berthold, F., K. Sahin, B. Hero, et al. (1997) "The current contribution of molecular factors to risk estimation in neuroblastoma patients." Eur J Cancer 33 : 2092– 7.

Berx, G., F. Van Roy. (2001) "The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression." Breast Cancer Res 3: 289-93.

Bestor, T., A. Laudano, R. Mattaliano, V. Ingram. (1988) "Cloning and sequencing of a cDNA encoding methyltransferase of mouse cells." J Mol Biol 203: 971-83.

Bhattacharjee, M.B., D.D. Armstrong, H. Vogel et al. (1997) "Cytogenetic analysis of 120 primary pediatric brain tumors and literature review." Cancer Genet Cytogenet 97:39–53

Bianchi, A.B., S. I. Mitsunaga, J. Q. Cheng et al (1995) "High frequency of inactivating mutations in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) in primary malignant mesotheliomas." Proc Natl Acad Sci USA 92:10854 –8.

- Biegel, J.A., J.Y. Zhou, L.B. Rorke, et al. (1999) "Germ-line and acquired mutations of INI1 in atypical teratoid and rhabdoid tumors." Cancer Res 59:74-9.
- Bienz, M. and H. Clever. (2000) "Linking colorectal cancer to Wnt signaling." Cell 103: 311-20.
- Blaeker H., B.K.A. Rasheed, R.E. McLendon et al. (1996) "Microsatellite analysis of childhood brain tumors" Genes Chromosomes & Cancer 15: 54-63.
- Bliek, J., S.M. Maas, J.M. Ruijter et al. (2001) "Increased tumor risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQ1OT1 methylation: occurrence of KCNQ1OT1 hypomethylation in familial cases of BWS." Hum Mol Genet 10:467-76.
- Bliek, J., C. Gicquel, S. Maas et al. (2004) "Epigenotyping as a tool for the prediction of tumor risk and tumor type in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome" J Pediatr 145: 796-9.
- Bornstein, P. (1995) "Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1." J Cell Biol 130: 503-6.
- Bouillet, P. and A. Strasser. (2002). "BH3-only proteins – evolutionarily conserved pro-apoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death." J. Cell Sci. 115: 1567-74.
- Bouvard, V., T. Zaitchouk, M. Vacher, et al. (2000). "Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice." Oncogene 19: 649-60.
- Bowman, L.C., R.P. Castleberry et al. (1997) "Genetic staging of unresectable or metastatic neuroblastoma in infants: a Pediatric Oncology Group study." J Nat Cancer Instit 89: 373-80.
- Bown N., S. Cotterill, M. Lastowska et al. (1999) "Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma." N Engl J Med 340: 1954–61.
- Brehm, A., E. A. Miska, D. J. McCance et al. (1998). "Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription." Nature (Lond.) 391: 597-601.
- Bremner, R., B.L. Cohen, M. Sopta, et al. (1995) "Direct transcriptional repression by pRb and its reversal by specific cyclins." Mol Cell Biol 15:3256-65.
- Breslow, N., B. McCann. (1971) "Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma." Cancer Res 31:2098-103.

Brodeur, G.M., G.S. Sekhon and M.N. Goldstein. (1977) "Chromosome aberrations in human neuroblastoma." Cancer 40: 2256-63.

Brodeur, G.M., R.C. Seeger, M. Schwab, et al. (1984) "Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage." Science 224 :1121-4.

Brodeur, G.M., J.M. Maris, D.J. Yamashiro et al. (1997) "Biology and genetics of human neuroblastoma" J Ped Hematol Oncol 19: 93-101.

Brodeur, G.M., J.M. Maris. (2002) "Neuroblastoma." In: Principles and Practice of Pediatric Oncology 4<sup>th</sup> edition. P.A. Pizzo and D.G. Poplack eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA. p. 895-937.

Brown, A.M.C. (2001) "Wnt signaling in breast cancer: have we come full circle?" Breast Cancer Res 3: 351-5.

Brucher, B.L.D.M., H. Geddert, C. Langner, et al. (2006) "Hypermethylation of hMLH1, HPP1, p14ARF, p16 INK4A and APC in primary adenocarcinomas of the small bowel." Int J Cancer. 119:1298-302

Bryan, E.J., V.J. Jokubaitis, N.L. Chamberlain, et al.(2002) "Mutation analysis of EP300 in colon, breast and ovarian carcinomas." Int J Cancer 102:137-41.

Caelles, C., A. Helmborg, and M. Karin. (1994). "p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes." Nature 370: 220-3.

Carter, M., J. Nicholson, F. Ross et al. (2002) "Genetic abnormalities detected in ependymomas by comparative genomic hybridisation." Br J Cancer 86: 929-39.

Cameron, E. E., K. E. Bachman, et al. (1999). "Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer." Nature Genetics 21: 103-7.

Chambon, PA. (1996) "Decade of molecular biology of retinoic acid receptors." FASEB J 10: 940-54.

Chen, T., Y. Ueda, J.E. Dodge et al. (2003) "Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b." Mol Cell Biol 23: 5594-605.



Choy, K.W., C.P. Pang, K.F. To et al. (2002) "Impaired expression and promotor hypermethylation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in retinoblastoma tissues." Invest Ophthalmol Vis Sci 43:1344-9.

Christofori G. and H. Semb. (1999) "The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumor-suppressor gene." Trends Biochem Sci 24: 73-6.

Clark, S.J., J. Harrison, C.L. Paul, M. Frommer. (1994) "High sensitivity mapping of methylated cytosines." Nucleic Acids Res 22:2990-7.

Colella,S., L. Shen, K.A. Baggerly, et al. (2003) "Sensitive and quantitative universal pyrosequencing methylation analysis of CpG sites." Biotechniques 35: 146–50.

Colot, V. and J.L. Rossignol. (1999) "Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device." BioEssays 21:402-11.

Conacci-Sorrell, M., J. Zhurinsky, A. Ben-Ze'ev. (2002) "The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer." J Clin Invest 109: 987-91.

Coqueret, O. (2002) "Linking cyclins to transcriptional control." Gene 299:35-55.

Cory, S. and J. M. Adams. (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nat. Rev. Cancer 2: 647-56.

Costello, J.F., M.S. Berger, H.S. Huang et al. (1996) "Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation." Cancer Res 56:2405-10.

Dammann, R., C. Li, J. Yoon, et al. (2000) "Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3." Nat Genet 25: 315–19

Dammann, R., G. Yang, G.P. Pfeifer (2001) "Hypermethylation of the cpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers." Cancer Res 61: 3105–9

Debaun, M.R., E.L. Niemitz, D.E. MacNeil et al. (2002) "Epigenetic alterations of H19 and LIT1 distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects." Am Hum Genet 70:604-11.

Desandes, E., J. Clavel, C. Berger et al. (2004) "Cancer incidence among children in France, 1990-1999." Pediatr Blood Cancer 43:749-57.

Dunn, B.K. (2003) "Hypomethylation: One side of a larger picture." Ann N Y Acad Sci 983:28-42.

Dlamini Z, Mbita Z, Zungu M. (2004) "Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis." Pharmacol Ther 101:1-15.

Dyer, S., E. Prebble, V. Davison et al. (2002) "Genomic Imbalances in pediatric intracranial ependymomas define clinically relevant groups" Am J Pathol 161:2133-41.

Eads, C.A., K. D. Danenberg, K. Kawakami, et al. (2000) "MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation." Nucleic Acids Res 28:E32.

Eads, C.A., R.V. Lord, K. Wickramasinghe et al. (2001) "Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma." Cancer Res 61:3410-8.

Eads, C.A., A.E. Nickel, P.W. Laird. (2002) "Complete genetic suppression of polyp formation and reduction of CpG-island hypermethylation in Apc(min/+) Dnmt1-hypomorphic mice." Cancer Res 62:1296-9.

Ebert, C., M. von Haken, B. Meyer-Puttlitz, et al. (1999) "NF2 mutations and chromosome 22q loss occur preferentially in intramedullary spinal ependymomas" Am J Pathol 155:627-32.

Ehrlich, M., N.E. Hopkins, G. Jiang, et al. (2003) "Satellite DNA hypomethylation in karyotyped Wilms tumors." Cancer Genet Cytogenet 141:97-105.

Elliott, M., E.R. Maher. (1994) "Beckwith-Wiedemann syndrome" J Med Genet 31:560-4.

Esteller, M., S.R. Hamilton, et al. (1999) "Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine- DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia." Cancer Res 59: 793-7.

Esteller, M., J. Garcia-Foncillas, E. Andion, et al. (2000a) "Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents." N Engl J Med 343:1350-4.

Esteller, M., A. Sparks, M. Toyota et al. (2000b) "Analysis of Adenomatous Polyposis Coli promoter hypermethylation in human cancer" Cancer Res 60: 4366-71.

Esteller M., P.G. Corn, S.B. Baylin, J.G. Herman. (2001) "A gene hypermethylation profile of human cancer." Cancer Res 61:3225-9.

Esteller, M. (2002) "CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future." Oncogene 21: 5427-40.

Esteller, M. (2005) "Aberrant DNA methylation as a Cancer-Inducing Mechanism." Annu Rev Pharmacol Toxicol 42:629-56.

Evans, D.G., S.M. Huson, D. Donnai, et al. (1992) "A clinical study of type 2 neurofibromatosis." Q J Med 84: 603–618.

Evans, D.G., A. Moran, A. King, et al. (2005) "Incidence of vestibular schwannoma and neurofibromatosis 2 in the North West of England over a 10-year period: Higher incidence than previously thought." Otol Neurotol 26: 93–7

Ewen, M.E., H. K. Sluss, H. K. Sherr, et al (1993). "Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins." Cell 73: 487-97.

Fenton, S. L., A. Dallol, A. Agathangelou et al. (2004) "Identification of the E1A-regulated transcription factor p120 E4F as an interacting partner of the RASSF1A candidate tumor suppressor gene." Cancer Res 64: 102–7

Flemington, E.K., S.H. Speck, W. G. Jr Kaelin.(1993) "E2F-1 mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product." Proc Natl Acad Sci USA 90: 6914-18.

Frommer, M., L.E. McDonald, D.S. Millar, et al. (1992) "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands." Proc Natl Acad Sci USA 89: 1827-31.

Fong, K.M., E.J. Biesterveld, A. Virmani et al. (1997) "FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations." Cancer Res 57:2256-67.

Fujiwara, K., N. Fujimoto, et al. (2005) "Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer." Clin. Cancer Res 11: 1219–25.

Gama-Sosa, M.A., V.A. Slagel, R.W. Trewyn et al. (1983) "The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors." Nucleic Acids Res 11:6883-94.

Gaston, V., Y. Le Bouc, V. Soupre et al. (2001) "Analysis of the methylation status of the KCNQ1OT1 and H19 genes in leukocyte DNA for the diagnosis and prognosis of Beckwith-Wiedemann syndrome." Eur J Hum Genet 9: 409-18.

Giaccia, A. J. and M. B. Kastan. (1998). "The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals." Genes Dev 12: 2973-83.

Gitan, R.S., H. Shi, C. M. Chen, et al. (2002) "Methylation-Specific Oligonucleotide Microarray: A New Potential for High-Throughput Methylation Analysis" Genome Res 12:158-64.

Goffin, J., E. Eisenhauer. (2002) "DNA methyltransferase inhibitors – state of the art." Annals of Oncology 13: 1699-716.

Good, D. J., P. J. Polverini, et al. (1990) "A tumor-suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin." Proc Natl Acad Sci USA 87:6624-8.

Gowher, H., O. Leismann, A. Jeltsch. (2000) "DNA of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine." EMBO J 19:6918-23.

Greger, V., E. Passarge, W. Hopping et al. (1989) "Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma." Hum Genet 83:155-8.

Grill, J., H. Avet-Loiseau, A. Lellouch-Tubiana, et al. (2002) "Comparative genomic hybridisation detects specific cytogenetic abnormalities in pediatric ependymomas and choroid plexus papillomas." Cancer Genet Cytogenet 136: 121-5.

Grill, J., C. Pascal, K. Chantal (2003). "Childhood ependymoma: A systematic review of treatment options and strategies." Paediatr Drugs 5: 533–43.

Gurney, J.G., M.A. Smith, G.R. Bunin. (1999) "SNC and miscellaneous intracranial and intraspinal neoplasms." In: Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, et al., eds. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER program 1975-1995. NIH Pub No 99-46-49. Bethesda, MD: National Cancer Institute, SEER Program: 51-63.

Haas, D., A.R. Ablin, C. Miller, et al. (1988) "Complete pathologic maturation and regression of stage IVS neuroblastoma without treatment." Cancer. 62:818-25.

Hamilton, D.W., M.E. Lusher, J.C. Lindsey, et al. (2005) "Epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene in ependymoma." Cancer Lett 227:75-81.

Hannon, G. J. and D. Beach (1994) "P15ink4b is a potential effector of TGF-B induced cycle arrest." Nature 371:257-61.

Hao, X., J. Willis, et al. (2000). "Loss of fragile histidine triad expression in colorectal carcinomas and premalignant lesions." Cancer Research 60: 18-21.

Harada, K., S. Toyooka, A. Maitra et al. (2002a) "Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines." Oncogene 21: 4345-9

Harada, K, S. Toyooka, N. Shivapurkar et al. (2002b) "Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines." Cancer Res 62:5897-901.

Harbour, J.W., R.X. Luo, A. Dei Santi, et al. (1999) "Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1." Cell 98: 859-69.

Harbour, J.W., D. C. Dean. (2000) "The Rb/E2f pathway : expanding roles and emerging paradigms." Genes Dev 14: 2393-409.

Haupt, S., M. Berger, Z. Goldberg and Y. Haupt. (2003) "Apoptosis – the p53 network." J Cell Science 116: 4077-85.

Hayashi, Y., S.C. Raimondi, A.T. Look, et al. (1990) "Abnormalities of the long arm of chromosome 6 in childhood acute lymphoblastic leukemia." Blood 76:1626-30.

Herman, J.G., Merlo A. et al. (1995) "Inactivation of the CKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers." Cancer Res 55:4525-30.

Herman J.G., J.R. Graff, S. Myohanen et al.(1996). "Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands." Proc Natl Acad Sci U S A 93:9821-6.

Hesson L., I. Bieche, D. Krex, et al. (2004) "Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A and BLU genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas" Oncogene 23: 2408-19.

Hogg, A., B. Bia et al. (1993) "Molecular mechanisms of oncogenetic mutations in tumours from patients with bilateral and unilateral retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci USA 90: 7351-5.

Hopkins-Donaldson S., A. Ziegler, S. Kurtz et al. (2003) "Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation." Cell Death Differ 10:356-64.

Horak P., D. Pils, G. Haller, et al. (2005) "Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer." Mol Cancer Res 3:335-43.

Hou, P., M. Ji, B. Yang et al (2006) "Quantitative Analysis of Promoter Hypermethylation in Multiple Genes in Osteosarcoma." Cancer 106 :1602-9.

Huang, B., P. Starostik, H. Schraut et al. (2003) "Human ependymomas reveal frequent deletions on chromosomes 6 and 9." Acta Neuropathol 106 : 357–62.

Iwakuma, T., K. Sakumi, et al. (1997) "High incidence of nitrosamine-induced tumorigenesis in mice lacking DNA repair methyltransferase." Carcinogenesis 18: 1631–5.

Ichimura, K., E. E. Schmidt, et al. (1996) "Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene." Oncogene 13: 1065–72.

Ikeda, S., M. Kishida, et al. (2000) "GSK-3b-dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by b-catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin." Oncogene 19: 537-45.

Ishikawa, J., H-J Xu, et al. (1991) "Inactivation of the retinoblastoma gene in human bladder and renal cell carcinomas." Cancer Res 51: 5736–43.

Jeuken, J.W.M., S.H. E. Sprenger, J. Gihuis et al. (2002) "Correlation between localization, age, and chromosomal imbalances in ependymal tumours as detected by CGH." J Pathol 197: 238-44.

Jones P. A. (1996) "DNA-methylation errors and cancer." Cancer Res 56:2463-7

Jones, P. A. and S. B. Baylin (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." Nat Rev Genet 3: 415-28.

Jones, P.L., G.J. Veenstra, P.A. Wade, et al. (1998) "Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription." Nat Genet 19:187-91.

Joseph B., G. Mamatha, G. Raman, et al. (2004) "Methylation status of RB1 promoter in Indian retinoblastoma patients." Cancer Biol Ther 3:184-7.

Juttermann, R., E. Li, R. Jaenisch. (1994) "Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation." Proc Natl Acad Sci USA 91: 11797-801.

Kamb, A., N.A. Gruis et al. (1994) "A cell cycle regulator potentially involved in many tumor types." Science 264:436-40.

Kamijo, T., F. Zindy et al.(1997) "Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF." Cell 91: 641-59.

Kaneko, Y., A.G. Knudson. (2000a) "Mechanism and relevance of ploidy in neuroblastoma" Genes Chromosomes Cancer 29: 89-95.

Kaneko, Y., S. Cohn. (2000b) "Ploidy and Cytogenetics of neuroblastoma." In: Neuroblastoma. G.M. Brodeur, T. Sawada, Y. Tsuchida, P.A. Voute eds. Elsevier Science B.V., Amsterdam, Netherlands. p 41-52.

Kantharidis, P. A. El Osta, M. De Silva et al. (1997) "Altered methylation of the human MRD1 promoter is associated with acquired multidrug resistance." Clin Cancer Res 3:2025-32.

Kiel, C., S. Wohlgemuth, F. Rousseau, et al. (2005) "Recognizing and defining true Ras binding domains II: in silico prediction based on homology modelling and energy calculations." Mol Biol 348: 759-75

Kim, G.D., J. Ni et al. (2002) "Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases." EMBO J. 21: 4183-95.

Kim, Y. and D.W. Seol.(2003) "TRAIL, a Mighty Apoptosis Inducer." Mol Cells 15: 283-93.

Kim, Y.I., A. Giuliano, K.D. Hatch, et al. (1994) "Global DNA hypomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma." Cancer 74:893-9.

Kino, T., H. Takeshima, M. Nakao et al. (2001) "Identification of the cis-acting region in the NF2 gene promoter as a potential target for mutation and methylation-dependent silencing in schwannoma." Genes Cells 6:441-54.

Kisseljova, N.P.; Kisseljev F.L. (2005). "DNA demethylation and carcinogenesis." Biochemistry (Mosc) 70:900-11.

Kleihues, P. W.K. Cavanee. (2000) "World Health Organization Classification of Tumours." Lyons: International Agency for Research on Cancer press: 208-41.

- Knudson, A. G. (2000). "Chasing the cancer demon." Annu Rev Genet 34: 1-19.
- Koga, Y., Y. Kitajima, et al. (2005) "Tumor progression through epigenetic gene silencing of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human biliary tract cancers." Ann Surg Oncol 12: 354-63.
- Kraus, J.A., W. de Millas, N. Sørensen et al. (2001) "Indications for a tumor suppressor gene at 22q11 involved in the pathogenesis of ependymal tumors and distinct from hSNF5/INI1" Acta Neuropathol 102: 69-74.
- Kusy, S., C.J. Larsen, J. Roche. (2004) "p14ARF, p15INK4b and p16INK4a methylation status in chronic myelogenous leukemia." Leuk Lymphoma. 45:1989-94.
- Kuzmin, I., J. W. Gillespie, A. Protopopov et al. (2002) "The RASSF1A tumor suppressor gene is inactivated in prostate tumors and suppresses growth of prostate carcinoma cells." Cancer Res 62: 3498-502.
- Laird, P.W. (2003) "The power and the promise of DNA methylation markers." Nat Rev Cancer 3: 253-66.
- Lee, E.J., B.B. Lee, J.W. Kim, et al. (2006) "Aberrant methylation of Fragile Histidine Triad gene is associated with poor prognosis in early stage esophageal squamous cell carcinoma." Eur J Cancer 42:972-80.
- Lee, W.H., R.A. Morton, J.L. Epstein, et al. (1994) "Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A 91:11733-7.
- Lei, H, S. Sjöberg-Margolin et al. (2002) "CDH1 mutations are present in both ductal and lobular breast cancer, but promoter allelic variants show no detectable breast cancer risk." Int J Cancer 98: 199-204.
- Lewis, J.D., R.R. Meehan, W. J. Henzel, et al. (1992) "Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA." Cell 69:905-14.
- Li, E., T.H. Bestor, R. Jaenisch. (1992) "Targeted mutation of the DANN methyltransferase gene results in embryonic lethality." Cell 69: 915-26.
- Li, E., C. Beard, R. Jaenisch. (1993) "Role for DANN methylation in genomic imprinting." Nature 366: 362-5.



- Li, L.C. and R. Dahiya. (2002) "MethPrimer: designing primers for methylation PCRs." Bioinformatics 18:1427-31.
- Li, Q., N. Ahuja et al. (1999) "Methylation and silencing of the thrombospondin-1 promoter in human cancer." Oncogene 18: 3284-9.
- Liang, B.C., D.A. Ross, H.S. Greenberg, P.S. Meltzer, J.M. Trent. (1994) "Evidence of allelic imbalance of chromosome 6 in human astrocytomas." Neurology 44:533-6.
- Lyko, F., B.H. Ramsahoye, R. Jaenisch (2000). "DNA methylation in *Drosophila melanogaster*." Nature 408:538-40.
- Lomas, J., M.J. Bello, D. Arjona et al. (2005). "Genetic and epigenetic alteration of the NF2 gene in sporadic meningiomas." Genes Chromosomes Cancer 42:314-9.
- Look, A.T., F.A. Hayes et al (1991). "Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study." J Clin Oncol 9:581-91.
- Lowe, S.W., H.E. Ruley, T. Jacks, et al. (1993) "P53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents." Cell 74: 957-67.
- Lubbert, M. (2000) "DNA methylation inhibitors in the treatment of leukemias, myelodysplastic syndromes and hemoglobinopathies: clinical results and possible mechanism of action." Curr Top Microbiol Immunol 249: 135-64.
- Lui, E.L.H., W.T.Y. Loo, L. Zhu et al. (2005) "DNA hypermethylation of TIMP3 gene in invasive breast ductal carcinoma." Biomedicine & Pharmacotherapy 59: 363-5.
- Lukas, J., D. Parry, L. Aagaard, et al. (1995) "Retinoblastoma protein-dependent cell cycle inhibition by the tumor suppressor p16." Nature (Lon.) 375: 503-6.
- McClatchey A.I., I. Saotome, K. Mercer et al. (1998) "Mice heterozygous for a mutation at the Nf2 tumor suppressor locus develop a range of highly metastatic tumors." Genes Dev 12:1121-33.
- McNally, R.J., L. Parker. (2006) "Environmental factors and childhood acute leukemias and lymphomas." Leuk Lymphoma 47:583-98.
- McNeil, D.E., M. Brown, A. Ching, et al. (2001) "Screening for Wilms tumor and hepatoblastoma in children with Beckwith-Wiedemann syndromes: a cost-effective model." Med Pediatr Oncol 37:349-56.

- Maitra, A. H. Roberts, A.G. Weinberg et al. (2001) "Loss of p16 (INK4a) expression correlates with decreased survival in pediatric osteosarcomas." Int J Cancer 95: 34-8.
- Mangelsdorf, D.J., R.M. Evan (1995). "The RXR heterodimers and orphan receptors." Cell 83: 841-50.
- Mao, L., A. Merlo et al. (1995) "A novel p16INK4a transcript." Cancer Res 55: 2995-7.
- Maris, J.M., M.J. Weiss, C. Guo, et al. (2000) "Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study." J Clin Oncol 18:1888-99.
- Martuza, R.L., R. Eldrige. (1988). "Neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis). N Engl J Med 318: 684-8.
- Mazewski, C., S. Soukup, E. Ballard, et al. (1999) "Karyotype studies in 18 ependymomas with literature review of 107 cases." Cancer Genet Cytogenet 113:1-8.
- Medema, R.H., R.E. Herrera et al. (1995) "Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein." Proc Natl Acad Sci USA 92: 6289-93.
- Meijer, L. (2005) "Le cycle de division cellulaire et sa régulation" In : *Cancérologie Fondamentale*. R. Lacave, C.J. Larsen, J. Robert. John Libbey Eurotext, Paris p 19-29.
- Merchant, T.E., R.K. Mulhern, M. J. Krasin et al. (2004) "Preliminary results from a phase ii trial of conformal radiation therapy and evaluation of radiation-related CNS effects for pediatric patients with localized ependymoma." J Clin Oncol 22:3156-62.
- Merup, M., T.C. Moreno, M. Heyman, et al. (1998) "6q deletions in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphomas." Blood 91:3397-3400
- Michael, D., D.G. Beer, C.W. Wilke, et al. (1997) "Frequent deletions of FHIT and FRA3B in Barrett's metaplasia and esophageal adenocarcinomas." Oncogene 15:1653-9.
- Muller, M., S. Wilder, D. Bannasch, et al. (1998). "p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs." J Exp Med 188: 2033-45.
- Myöhänen, S., S. B. Baylin, et al. (1998). "Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia." Cancer Res 58: 591-3.
- Nakamura, M., K. Sugita et al. (1999) "p16/MTS1/INK4A gene is frequently inactivated by hypermethylation in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 translocation." Leukemia 13: 884-90.

- Nan, X., F.J. Campoy, A. Bird. (1997) "MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin." Cell 88:471-81.
- Nan, X., H.H. Ng, C.A. Johnson, et al. (1998) "Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex." Nature 393:386-9.
- Narayan, A., W. Ji, X.Y. Zhang, et al. (1998) "Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas." Int J Cancer 77:833-8.
- Nevins, J.R. (1998) "Towards an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families." Cell Growth Differ 9: 585-93.
- Neumann, E., D.K. Kalousek, M.G. Norman et al. (1993) "Cytogenetic analysis of 109 pediatric central nervous system tumors." Cancer Genet Cytogenet. 71:40-9.
- Nielsen, S.J., R. Schneider, U.M. Bauer, et al. (2001) "Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters." Nature 412: 561-5.
- Nienhuis, A.W., C.E. Dunbar, B.P. Sorrentino. (2006) "Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells." Mol Ther 13:1031-49.
- Oakeley, E.J.(1999) "DNA methylation analysis: a review of current methodologies." Pharmacol Ther 84:389-400.
- Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa et al. (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." Science 288: 1053-8.
- Oh, J.H., H.S. Kim, H.H. Kim et al. (2006) "Aberrant methylation of p14ARF gene correlates with poor survival in osteosarcoma." Clin Orthop Relat Res 442: 216-22.
- Ohta, M., H. Inoue, M.G. Coticelli, et al. (1996) "The FHIT gene spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancer." Cell 84:587-97.
- Ohtani-Fujita, N., T. Fujita, A. Aoike et al (1993). "CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene." Oncogene 8:1063-7
- Okano, M., D.W. Bell, D. A. Haber, W. Li. (1999) "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." Cell 99: 247-57.

Olsson, M., and T. Lindahl. (1980) "Repair of alkylated DNA in Escherichia coli. Methyl group transfer from O6-methylguanine to a protein cysteine residue." J Biol Chem 255: 10569–71.

Oppenheimer, O., M. Alaminos, W.L. Gerald. (2003) "Genomic medicine and neuroblastoma." Expert Rev Mol Diagn 3 :39-54.

Paz, M. F., S. Avila, M. F. Fraga, et al. (2002) "Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors." Cancer Res 62:4519-24.

Pekarsky, Y., N. Zanesi, et al. (2002). "FHIT: from gene discovery to cancer treatment and prevention." Lancet Oncology 3: 746-54.

Pepper, W. (1901) "A study of congenital sarcoma of the liver and suprarenal." Am J Med Soc 121: 287-99.

Peter M. (2004) "The flip side of FLIP" Biochem J 382: e1–e3.

Picard E., C. Seguin, et al. (1999) "Expression of retinoid receptor genes and proteins in non-small-lung cancer." J Natl Cancer Inst 91: 1059–66.

Pfahl, M. (1994) "Vertebrate receptors: molecular biology, dimerization and response elements." Semin Cell Biol 5: 95–103.

Pfeifer G. P. and R. Dammann R (2005). "Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors." Biochemistry (Mosc) 70:576-83.

Plantaz, D., G. Mohapatra, K.K. Matthay et al. (1997) "Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybridization." Am J Pathol 150: 81-9.

Plantaz, D., J. Vandesompele, N. Van Roy et al. (2001) "Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification." Int J Cancer 91:680-6.

Pomerantz, J., N. Schreiber-Agus, N. Liegeois et al. (1998) "The Ink4 tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53." Cell 92: 713-23.

Qiu G.H., L.K. Tan, K.S. Loh, et al. (2004) "The candidate tumor suppressor gene BLU, located at the commonly deleted region 3p21.3, is an E2F-regulated, stress-responsive gene and

inactivated by both epigenetic and genetic mechanisms in nasopharyngeal carcinoma” Oncogene 23 :4793–806.

Qu, G., L. Dubeau, A. Narayan, et al. (1999) “Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential.” Mutat Res 423:91-101.

Quackenbush, J.(2006) “Microarray analysis and tumor classification.” N Engl J Med 354:2463-72.

Quelle, D. E., F. Zindy, et al. (1995) “Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest.” Cell 83: 993–1000.

Reardon, D.A., R.E. Entrekina, J.Sublett et al. (1999) “Chromosome Arm 6q Loss Is the Most Common Recurrent Autosomal Alteration Detected in Primary Pediatric Ependymoma.” Genes Chromosomes Cancer 24:230–237.

Rhee I, K.W. Jair et al. (2000) “CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1.” Nature 404: 1003-7.

Rhee I, K. E. Bachman, B.H. Parkman et al. (2004) “DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells.” Nature 416: 552-6.

Robertson, K.D., A.P. Wolffe. (2000) “DNA methylation in health and disease.” Nat Rev Genet 1:11-9.

Robertson, K.D., S. Ait-Si-Ali, T. Yokochi, et al.(2000) “DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters.” Nat Genet 25:338-42.

Rountree, M.R., K.E. Bachman, S.B. Baylin. (2000) “DNMT1 binds HDAC2 and new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci.” Nat Genet 25:269-77.

Rousseau E., M.M. Ruchoux, F. Scaravilli et al.(2003) “CDKN2A, CDKN2B and p14 ARF are frequently and differentially methylated in ependymal tumours.” Neuropathology and Applied Neurobiology 29: 574–583

Rubio, M.C., V. Ramesh, M.M. MacCollin, et al. (1994) “Analysis of the neurofibromatosis 2 gene in human ependymomas.” Cancer Res 54: 45-7.

Sakai, T., J. Toguchida, N. Ohtani et al. (1991) "Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene." Am J Hum Genet 48:880-8.

Santini, V., H.M. Kantarjian, J.P. Issa. (2001) "Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications." Ann Intern Med 134:573-86.

Sarrio, D., G. Moreno-Bueno, D. Hardisson et al. (2003) "Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability." Int J Cancer 106:208-15 .

Sasaki, S, E. Ito, T. Toki, et al. (2000) "Cloning and expression of human B cell-specific transcription factor BACH2 mapped to chromosome 6q15." Oncogene 19: 3739-49

Schwab, M., F. Westermann, B. Hero et al. (2003) "Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology" Lancet Oncol 4: 472-80.

Shaw, R.J., E.K. Akufo-Tetteh, J.M. Risk et al. (2006) "Methylation enrichment pyrosequencing: combining the specificity of MSP with validation by pyrosequencing." Nucleic Acids Res 34:e78.

Shimada, H., I. M. Ambros, L. P. Dehner et al. (1999) "The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system)." Cancer. 86:364-72.

Seeger, R.C., G.M. Brodeur, H. Sather et al. (1985) "Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas" N Engl J Med 313 :1111- 6.

Serrano, M., G. J. Hannon, and D. Beach. (1993) "A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4." Nature (Lond.) 366: 704-7.

Sevenet, N., A. Lellouch-Tubiana, D. Schofield, et al. (1999) "Spectrum of hSNF5/INI1 somatic mutations in human cancer and genotype-phenotype correlations." Hum Mol Genet. 8:2359-68.

Shen, C. Y., J.C. Yu, et al (2000). "Genome-wide search for loss of heterozygosity using laser capture microdissected tissue of breast carcinoma: an implication for mutator phenotype and breast cancer pathogenesis." Cancer Res 60: 3884-92.

Shen, C.Y., J.C. Yu et al. (2000) "Genome-wide search for loss of heterozygosity using laser capture microdissected tissue of breast carcinoma: an implication for mutator phenotype and breast cancer pathogenesis." Cancer Res 60: 3884-92.

Sherr, C. J. (1993) "Mammalian G1 cyclins." Cell 73: 1059-65.

- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1995). "Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases." Genes Dev 9: 1149-63.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts. (1999) "Positive and negative regulation by CDK inhibitors." Genes Dev 13: 1501-12.
- Sherr, C.J. (2000) "The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited." Cancer Res 60: 3689-95.
- Shivakumar, L., J. Minna, T. Sakamaki, et al. (2002) "The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation" Mol Cell Biol 22: 4309–4318
- Sieber, O.M., Tomlinson, I.P. et al. (2000) "The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor – genetics, function and disease." Mol Med Today 6:462-9.
- Singal R., G.D. Ginder. (1999) "DNA methylation." Blood 93: 4059-70.
- Sirchia S. M., A. T. Ferguson et al. (2000) "Evidence of epigenetic changes affecting the chromatin state of the retinoic acid receptor  $\beta$ 2 promoter in breast cancer cells." Oncogene 19: 1556–63.
- Skulachev VP.(1998) "Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades." FEBS Lett 423:275-80.
- Soejima H., W. Zhao, et T. Mukai. (2005) "Epigenetic silencing of the MGMT gene in cancer" Biochem Cell Biol 83: 429–37.
- Song, M. S., S.J. Song, N.G. Ayad, et al. (2004) "The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex." Nat Cell Biol 6: 129–37
- Spengler, D., M. Villalba, A. Hoffmann, et al. (1997) "Regulation of apoptosis and cell cycle arrest by Zacl, a novel zinc finger protein expressed in the pituitary gland and the brain." EMBO J 16:2814–25
- Sporn, M.B.,A.B. Roberts, D.S.Goodman (1994) "The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine." 2nd edn, Raven Press, New York.
- Steliarova-Foucher, E., C. Stiller, P. Kaatsch et al. (2004) "Geographical patterns and time trends of cancer incidence and survival among children and adolescents in Europe since the 1970s (the ACCIS project): an epidemiological study." Lancet 364: 2097-105.

Strother, D.R., I.F. Pollack, P.G. Fisher et al. (2002) "Tumors of the Central Nervous System." In: Principles and Practice of Pediatric Oncology 4<sup>th</sup> edition. P.A. Pizzo and D.G. Poplack eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA. p. 785-7.

Stuart, E.T., R. Haffner, M. Oren, et al. (1995) "Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression". EMBOJ 14:5638– 45.

Takahira T., Y. Oda, S. Tamiya, et al.(2005) "Alterations of the RB1 gene in dedifferentiated liposarcoma." M. Mod Pathol 18:1461-70.

Takeichi, M. (1991) "Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator." Science 251: 1451-5.

Tanaka, H., Y. Shimada, H. Harada, et al. (1998) "Methylation of the 50 CpG island of the FHIT gene is closely associated with transcriptional inactivation in esophageal squamous cell carcinomas." Cancer Res 58:3429–34.

Tao, W. and A.J. Levine (1999) "p19<sup>ARF</sup> stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 6937–41.

Teitz, T., T. Wei, M.B. Valentine, et al. (2000) "Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN." Nat Med 6:529–35.

Thomas, G.A., C. Raffel. (1991) "Loss of heterozygosity on 6q, 16q, and 17p in human central nervous system primitive neuroectodermal tumors." Cancer Res 51:639–43.

Tommasi, S., R. Dammann, Z. Zhang, et al. (2005) "Tumor susceptibility of Rassfla knockout mice." Cancer Res 65 : 92–8.

Tong, C.Y.K., H.K. Ng, J.C.S. Pang, et al. (1999) "Molecular genetic analysis of non-astrocytic gliomas." Histopathology 34:331-41.

Topaloglu, O., M.O. Hoque, Y. Tokumaru, et al. (2004) "Detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor and bronchoalveolar lavage of patients with lung cancer." Clin Cancer Res 10:2284-8.

Torrisani, J. et F. Lopez. (2003) "Methylation de l'AND et régulation épigénétique des cancers." Hépto-Gastro 6 : 455-67.

Tosi, G.M., C. Trimarchi, M. Macaluso, et al. (2005) "Genetic and epigenetic alterations of RB2/p130 tumor suppressor gene in human sporadic retinoblastoma: implications for pathogenesis and therapeutic approach." Oncogene 24:5827-36.



- Tost, J., J. Dunker, et I.G. Gut. (2003) "Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by pyrosequencing." Biotechniques 35: 152–6.
- Trofatter J.A., M. M. MacCollin, et al. (1993) "A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor." Cell 75:791– 800.
- Tsuzuki, T., S. Tsunoda, et al. (1996) "Alterations of retinoblastoma, *p53*, *p16(CDKN2)*, and *p15* genes in human astrocytomas." Cancer 78: 287–93.
- Ueki, K., Y. Ono, J.W. Henson, et al. (1996) "CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated." Cancer Res 56:150-3.
- Van Noesel, MM, S. van Bezouw, G.S. Salomons, et al. (2002) "Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation." Cancer Res 62:2157-61.
- Van Noesel M.M., S. van Bezouw, P.A. Voute, et al. (2003) "Clustering of hypermethylated genes in neuroblastoma." Genes Chromosomes Cancer 38:226-33.
- Van Steensel B, Henikoff S. (2003) "Epigenomic profiling using microarrays." Biotechniques 35:346-50.
- Versteeg, I., N. Sevenet, J. Lange et al. (1998) "Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive pediatric cancer." Nature 394:203-6.
- Vertino, P.M., R.W.C. Yen, J. Gao, S.B. Baylin. (1996) "De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5)-methyltransferases." Mol Cell Biol 16: 4555-65.
- Villar-Garea A., M.F. Fraga, J. Espada J, M. Esteller. (2003) "Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells." Cancer Res. 63:4984-9.
- Vogelstein, B., D. Lane, A.J. Levine. (2000) "Surfing the p53 network." Nature 408:307-10.
- Von Haken, M.S., E. C. White, L. Daneshvar-Shyesther, et al. (1996) "Molecular genetic analysis of chromosome arm 17p and chromosome arm 22q DNA sequences in sporadic pediatric ependymomas." Genes Chrom Cancer 17: 37-44.
- Wakefield, R.I., B.O. Smith, X. Nan, et al. (1999) "The solution structure of the domain from MeCP2 that binds to methylated DNA." J Mol Biol 291:1055-65.

Ward, S., B. Harding, P. Wilkins, et al. (2001) "Gain of 1q and loss of 22 are the most common changes detected by comparative genomic hybridisation in paediatric ependymoma." Genes Chromosomes Cancer 32:59-66.

Weksberg, R., J. Nishikawa, O. Caluseriu et al. (2001) "Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1." Hum Mol Genet 10: 2989-3000.

Westermann, F., M. Schwab. (2002) "Genetic parameters of neuroblastomas" Cancer Letters 184: 127-47

Widschwendter, M., J. Berger, et al. (2000) "Methylation and silencing of the retinoic acid receptor  $\beta$ 2 gene in breast cancer." J Natl Cancer Inst 92: 826-832.

Widschwendter, M., G. Jiang, C. Woods, et al. (2004) "DNA hypomethylation and ovarian cancer biology." Cancer Res. 64:4472-80.

Wijnhoven, B.P.L., W.N.M. Dinjens et al. (2000) "E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer." Br J Surg 87: 992-1005

Wong, I.H., J. Chan, J. Wong, P.K. Tam. (2004) "Ubiquitous aberrant RASSF1A promoter methylation in childhood neoplasia." Clin Cancer Res 10:994-1002

Wong, N., W. C. Lam, P.B. Lai et al. (2001). "Hypomethylation of Chromosome 1 Heterochromatin DNA Correlates with q-Arm Copy Gain in Human Hepatocellular Carcinoma" Am. J Pathol 159: 465-71.

Wu, G.S., T.F. Burns, E.R. McDonald et al. (1997) "KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene." Nat Genet 17:141-3.

Xiao G.H., J. Chernoff, et J. R. Testa. (2003) "NF2: The Wizardry of Merlin" Genes, Chromosomes & Cancer 38:389-99.

Xing, E.P., N. Yie Y., Song Y. Et al. (1999) "Mechanisms of inactivation of p14<sup>ARF</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, and p16<sup>INK4a</sup> Genes in human esophageal squamous cell carcinoma". Clin Cancer Res 5: 2704-13.

Xu, H. J., P. Cairns, et al. (1993) "Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumour progression." Int J Cancer 53: 781-4.

- Xu, X-C, N. Sneige, et al. (1997) "Progressive decrease in nuclear retinoic acid receptor  $\beta$  messenger RNA level during breast carcinogenesis." Cancer Res 57: 4992–6.
- Xu, X-C, X. Liu Xet al. (1999) "Expression and up-regulation of retinoic acid receptor- $\beta$  is associated with retinoid sensitivity and colony formation in esophageal cancer cell lines." Cancer Res 59: 2477–83.
- Yang Q., T. Sakurai, K. Kakudo (2002). "Retinoid, retinoic acid receptor beta and breast cancer." Breast Cancer Res Treat. 76:167-73.
- Yang, Q., P. Zage, D. Kagan, et al.(2004) "Association of epigenetic inactivation of RASSF1A with poor outcome in human neuroblastoma." Clin Cancer Res 10:8493-500.
- Yang Q.W., S.Liu, Y. Tian, et al. (2003) "Methylation-associated silencing of the thrombospondin-1 gene in human neuroblastoma." Cancer Res 63:6299-310.
- Yeh, W. C., A. Itie, A. Elia, et al. (2000) "Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development." Immunity 12:633–42.
- Yoder, J.A., C. P. Walsh, T.H. Bestor. (1997) "Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites." Trends Genet 13: 335-40.
- Yoshiura, K., Y. Kanai, et al. (1995) "Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas." Proc Natl Acad Sci 92: 7416-9.
- Zamecnik, J., M. Snuderl, T. Eckschlager et al.(2003) "Pediatric intracranial ependymomas: Prognostic relevance of histological, immunohistochemical, and flow cytometric factors." Mod Pathol 16: 980–91.
- Zeschnick, M., D. Lohmann, B. Horsthemke. (1999) "A PCR test for the detection of hypermethylated alleles at the retinoblastoma locus." J Med Genet. 36:793-4.
- Zhang, F., L. Tan, L.M. Wainwright, et al. (2002) "No evidence for hypermethylation of the hSNF5/INI1 promoter in pediatric rhabdoid tumors." Genes Chromosomes Cancer 34:398-405.
- Zhang, Y., Y. Xiong and W.G. Yarbrough. (1998) "ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: *ARF-INK4a* locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways." Cell 92: 725–34.

Zhang, H. S., M. Gavin, A. Dahyia, et al. (2000) "Exit from G1 and S phase of cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSW1/SNF and Rb-hSWI/SNF." Cell 101: 79-89.

Zhang, Z.K., K.P. Davies, J. Allen et al. (2002) "Cell cycle arrest and repression of cyclin D1 transcription by INI1/hSNF5." Mol Cell Biol 22: 5975-88.

Zhang, L., B. Fang B. (2005). "Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer." Cancer Gene Ther 12:228-37.

Zheng P., J.C. Pang, A.B. Hui, H. Ng. (2000) "Comparative genomic hybridization detects losses of chromosomes 22 and 16 as the most common recurrent genetic alterations in primary ependymomas" Cancer Genetics and Cytogenetics 122:18-25.



# ANNEXE I

**Figure 25 - Primer, température d'annelisation et taille des produits PCR de MSP**

	Sense primer, 5'-3'	Antisense primer, 5'-3'	Taille produit (pb)	Annealing T(°C)
APC U	AAACCAAAACACTCCCCATTC	AGTTATATGTTGGTTATGTGTGTTTAT	76	60
APC M	GAACCAAAACGCTCCCCAT	TTATATGTCGGTTACGTGCGTTTATAT	74	65
BLU U	TTTGTGGGTTATAGTTTGAGAAAGTG	AACAAATTAACCACACCTACAC	233	Hesson, 2004
BLU M	TTCGTGGGTTATAGTTCGAGAAAGCG	AACGAATTAACCGCGCCTACGC	233	Hesson, 2004
CASP8 U	TAGGGGATTTGGAGATTGTGA	CCATATATATCTACATTCAAAAACAA	321	50
CASP8 M	TAGGGGATTCGGAGATTGCGA	CGTATATCTACATTCGAAACGA	322	58
DAPK U	GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	CAAAATCCCTCCCAAACACCAA	106	60
DAPK M	GGATAGTCGGATGTTAACGTC	CCCTCCCAAACGCCGA	98	60
ECAD U	TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT	CACAACCAATCAACAACACA	97	57
ECAD M	TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT	TAATAAAAAATTCACCTACCGAC	115	57
EP300 U	TTGTTTGTATATATTTTATTGTGG	AACCAATACTAAAACACCCA	145	55
EP300 M	TCGTTCTGATATATTTTATCGCG	GACCAATACTAAAACGCCCG	145	55
FHIT U	TTGGGGGTGGGGTTGGGGTTTATG	CATAACAACACCAACCCCACTA	74	64
FHIT M	TTGGGGCGCGGGTTTTACGC	CGTAAACGACGCCGACCCCACTA	74	64
FLIP U	TGG TTA TTT GTA GTT TTT TGG AGT	AAT AAC AAC AAC AAA AAA ATC CA	211	50
FLIP M	GTT ATT TGT AGT TTT TCG GAG C	CAA CGA CAA AAA AAT CCG	203	58
INI1 U	GTTTTGGTTTTTTTTGGTTTAGTATGT	TCAAAACCAATCATATAAAACTCACC	186	60
INI1 M	TTTCGGTTTTTTTTCGGTTTAGTAC	GAAACCGATCATATAAAACTCGC	183	60
MGMT U	TTTGTTTGTGATGTTGTAGGTTTTGT	AACTCCACTCTTCCAAAACAACAACA	93	55
MGMT M	TTTCGAACGTTCTAGGTTTTCGC	GCACTCTTCCGAAAACGAAAACG	81	55
NF2 U	GTGGAGTTATTTTAAAGGAGGT	TAACACAACCAACCAAAAACTAA	107	58
NF2 M1	GAGTTATTTTAAAGGAGGCGGGAC	AAACTAACGCATAAATACTACG	125	53
NF2 M2	TAAAGGAGGCGGGACGGAGC	ACGCAACCGAACCGAAAACCTAACG	120	60
P14U	TTTTTGGTGTAAAGGGTGGTGTAGT	CACAAAAACCCCTCACTCACAACAA	132	60
P14M	GTGTTAAAGGGCGGCGTAGC	AAAACCCCTACTCGCGACGA	122	60
P15U	TGTGATGTGTTTGTATTTGTGGTT	CCATACAATAACCAAAACAACCAA	154	60
P15M	GCGTTCGTATTTGCGGTT	CGTACAATAACCGAACGACCGA	148	60
P16 U	GGTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CCCAACCCCAAAACCAACCATAA	151	60
P16 M	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACCGCGACCGTAA	151	65
RASSF1AU	TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG	CAAACCCCAAAACTAAAAACAA	105	60
RASSF1AM	GTGTTAACCGGTTGCGTATC	AACCCCGGAACTAAAAACGA	93	60
RAR $\beta$ U	TTGAGAATGTGAGTGATTGA	AACCAATCCAACCAAAAACAA	146	59
RAR $\beta$ M	TCGAGACGCGAGCGATTCCG	GACCAATCCAACCGAAAACGA	146	59
RB1 U	GGGAGTTTTTGGATGTGAT	ACATCAAAACACACCCCA	172	58
RB1M	GGGAGTTTCGGGACGTGAC	ACGTCGAAACCGGCCCG	172	66
TIMP3 U	TGTGTTGGAGGTTAAGGTTGTTTT	ACTCTCAAAAATTACCATACACACC	116	60
TIMP3 M	GCGTCGGAGGTTAAGGTTGTT	CTCTCAAAAATTACCGTACGCG	116	60
TNFRSF10C U	GAATTTTTTATGTGTATGAATTTAGTTAAT	CCATCAAAACAACCAAAAACA	125	52
TNFRSF10C M	TTACGCGTACGAATTTAGTTAAC	ATCAACGACCGACCGAAAACG	123	50
TNFRSF10D U	TTGGGGATAAAGTGTTTTGATT	AAACCAACAACAAAACCAACA	138	60
TNFRSF10D M	GGGATAAAGCGTTTCGATC	CGACAACAAAACCGCG	145	60



## ANNEXE II

---

Publication clinique pendant la période de la thèse

### **1. Giant Cell Tumor Of Cervical Spine In An Adolescent.**

Michalowski MB, Pagnier-Clémence A, Chirossel JP, Nugues F, Kolodié H, Pasquier B, Plantaz D.

*Medical and Pediatric Oncology 41: 58-62, 2003.*





## Proceedings of the Tumor Board of the Department of Pediatrics, CHU Grenoble, France

Dominique Plantaz, MD, Guest Editor, Margaret H. Collins, MD, Series Editor,  
and Giulio J. D'Angio, MD, Series Co-Editor

### Giant Cell Tumor of Cervical Spine in an Adolescent

Mariana B. Michalowski, MD,<sup>1,2</sup> Anne Pagnier-Clémence, MD,<sup>1</sup> Jean Paul Chirossel, MD,<sup>3</sup>  
Frédérique Nugues, MD,<sup>4</sup> Hélène Kolodié, MD,<sup>5</sup> Basile Pasquier, MD,<sup>6</sup>  
and Dominique Plantaz, MD, PhD<sup>1\*</sup>

**Key words:** giant cell tumor of spine; bone tumor; childhood cancer; radiotherapy; chemotherapy

#### Mariana Michalowski, MD (Pediatric Resident)

The patient is a boy, 14 years old, who presented to this hospital in November, 1997 with history of cervical pain related to effort for 3 months. He had only partial relief with anti-inflammatory medications. He denied vomiting, fever or any infectious or neurologic symptoms. The patient had no relevant previous medical history and had experienced normal development.

The physical examination revealed no neurologic sign or any other clinical finding.

All blood studies were normal.

#### Frédérique Nugues, MD (Pediatric Radiologist)

Cervical radiography was performed and showed degeneration of the C3 vertebra; i.e., “vertebra plana.”

Magnetic resonance imaging (MRI) of the affected bone was obtained immediately following radiography and it showed an aggressive infiltrating tumor in C3 with an extension to the posterior half of the vertebra and into the soft tissues (Fig. 1).

This osteolytic lesion of the cervical spine in a child might be due to Langerhans cell histiocytosis. Since this boy was already 14 years old, other diagnoses also come to mind including aneurysmal bone cyst, and such primary bone tumors as telangiectatic osteosarcoma, osteoblastoma, and giant cell tumor (GCT) of bone.

#### Dr. Michalowski

After this initial evaluation, surgery was indicated to provide an exact diagnosis and prevent further bony disintegration. Our patient was then submitted to a surgical intervention that included a total resection of the body of C3 with autologous bone graft and cementing from C2–C4

anteriorly. The tumor tissue was dark brown and very hemorrhagic. The possibility of a wider excision was restricted by neurologic and vascular limitations. The patient presented no post-surgical complications.

#### Basile Pasquier, MD (Pathologist)

Grossly, the tumor was friable, soft, and dark brown. Microscopic examination of the specimen showed osteoclast-like multinucleated giant cells in an abundant fibrous stroma with multiple ectatic capillaries. There were very few mitoses. The pathologic diagnosis was GCT of bone (Fig. 2). Indeed, the characteristic histologic appearance of GCT displays a high number of osteoclast-like multinucleated giant cells, resulting in the classification “osteoclastoma” or “GCT” [1]. Apart from the multinucleated giant cells, there are two mononuclear cell types. The first cell type has a round morphology resembling monocytes; the second is a spindle-shaped fibroblast-like stromal cell [2]. Mitotic activity has no prognostic significance. There are recent studies demonstrating that the true tumor cells are the fibroblast-like cells having the

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, CHU Grenoble, France

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Department of Neurosurgery, CHU Grenoble, France

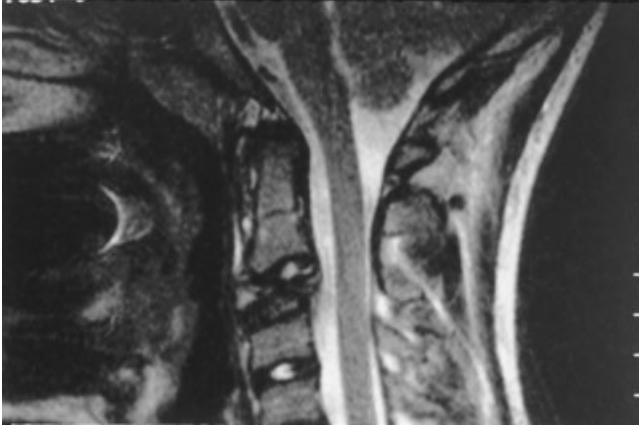
<sup>4</sup>Pediatric Radiology Service, CHU Grenoble, France

<sup>5</sup>Department of Radiotherapy, CHU Grenoble, France

<sup>6</sup>Department of Pathology, CHU Grenoble, France

\*Correspondence to: Dr. Dominique Plantaz, Département de Pédiatrie, CHU Grenoble, BP 217X, 38045 Grenoble cedex 9, France. E-mail: DPlantaz@chu-grenoble.fr

Received 8 January 2002; Accepted 19 June 2002



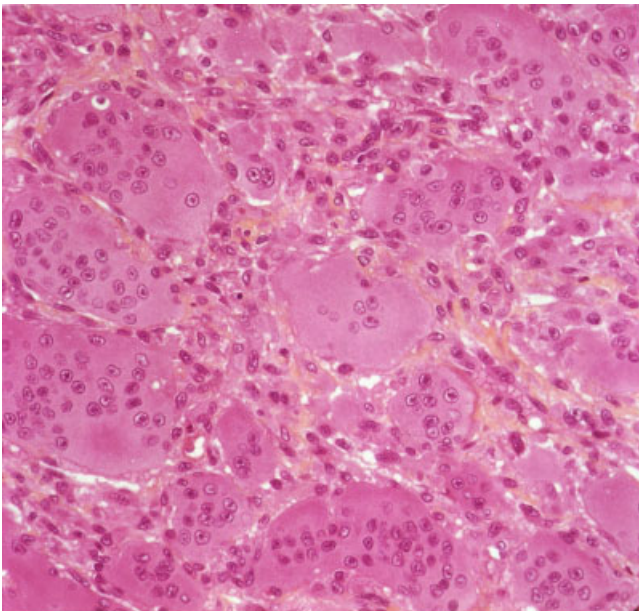
**Fig. 1.** T2 weighted MRI of the cervical spine at initial diagnosis. Sagittal view showing osteolysis of C3 with vertebra plana.

capacity to recruit and interact with multinucleated giant cells [2–7].

Histochemical and ultrastructural methods for differentiating GCT from its variants have not been of value, so the distinction must be made by correlating histologic features with roentgenographic and surgical findings [8,9].

#### Dr. Michalowski

Giant cell tumors (GCT) of bone are rare, accounting for fewer than 5% of primary bone neoplasms. They generally appear in skeletally mature individuals with a peak incidence in the third and fourth decades of life. The incidence of GCT in skeletally immature patients ranges in



**Fig. 2.** Light microscopic appearance of bone GCT displaying osteoclast-like multinucleated giant cells within a fibrous stroma (Hematoxylin and eosin,  $\times 200$ ).

two reports from 1.7% [10] to 5.7% [11]. No bone tumor markers exist for GCT, and DNA analysis has limited value in predicting its biologic behavior. This is one of the few osseous neoplasm showing a female sexual predilection (1.3: 1) [8]. GCT are almost always located in the epiphyseal region of the long tubular bones with preference for the distal femur and proximal tibia [12–15]. GCT of the vertebrae above the sacrum are uncommon, accounting for only 4% of 425 cases in the Mayo Clinic series [8]. The tumor originates usually in the vertebral body, with subsequent involvement of the vertebral arch or even adjacent vertebrae [16]. It is generally considered a benign lesion with a tendency toward a locally aggressive behavior. Metastases are very rare; only 17 examples were found in the Mayo Clinic files [8].

Most authors now believe that histopathologic grading has no prognostic value and has no correlation with the recurrence rate [17–21].

#### Jean-Paul Chirossel, MD (Neurosurgeon)

Treatment of bone GCT depends on the lesion location, size, and infiltration. If possible, the tumor should be resected using wide en-bloc excision. This achieves maximum reduction of risk of local recurrence. However, for non-expendable bones, intralesional curettage should be performed through a large cortical window with extensive burring back to normal bone [22,23]. Adjuvant treatment of the bony bed with phenol or liquid nitrogen also may lower the recurrence risk. The defect should be filled with bone graft and/or cement.

#### Dr. Michalowski

Indeed, local recurrence of between 30–50% was observed after simple curettage. Radiotherapy has widely been used in non-resectable tumors. However, a sarcomatous transformation is reported particularly after radiotherapy with doses exceeding 45 Gray in percentages that range from 5% up to peaks of 29% [16,24].

GCT of the vertebral column located above the sacrum should obviously be considered highly dangerous. First, it is difficult to obtain a wide, complete excision; second, local complications threaten after possible recurrence; and third, sarcomatous transformation would probably have catastrophic repercussions.

Published data of vertebral GCT suggest that these tumors often have different presentations when compared to GCT localized in other sites: younger age, a predilection for females and a lower tendency towards local recurrence, despite less aggressive treatment [8,16,25].

Considering these and the particular characteristics of our patient (young age, the fact that he was still growing, the rare location of his tumor), we decided to keep this patient under close surveillance without any further treatment.

Unfortunately, sensory impairment in the right arm and neck pain started 6 months after surgery. Physical examination did not reveal any motor or sensory impairment.

#### Dr. Nugues

An emergency computed tomographic scan (CT) showed a major local recurrence with osteolysis from C2 to C4 and destruction of the bone autograft. MRI was only performed after surgical removal of the stabilization device and showed a large tumor, with spinal cord compression and extension to the retropharyngeal and cervical spaces (Fig. 3a,b). According to the radiologic grading system developed by Campanacci and coauthors, it was a grade III lesion (30% of cases) characterized by osseous destruction, poorly outlined margins, extension into subchondral bone and soft tissue, cortical breakthrough and a soft tissue mass. In stage I lesion (10% of cases), the involved bone maintains a normal contour, the lesion is radiolucent, enlarging with sharply defined margination; and in stage II lesions (60% of cases) there is cortical erosion, deformity, and expansion of bone with limited endosteal response.

#### Anne Pagnier-Clémence, MD (Pediatric Oncologist)

When a GCT recurs, it usually does so within the first 2 years after treatment. Such recurrences are typically large lesions, and in cervico-thoracic vertebrae, would likely compromise the function of the spinal cord or the emerging nerve roots. This factor must be considered in the management of GCT of vertebrae above the sacrum, especially because total resection as opposed to subtotal excision is rarely possible for these tumors. We also have to remember that spontaneous sarcomatous transformation may occur. We had to know what exactly was happening. The patient was therefore submitted to a large

tumor biopsy and resection of cementing material. Complete surgical excision was impossible.

#### Dr. Pasquier

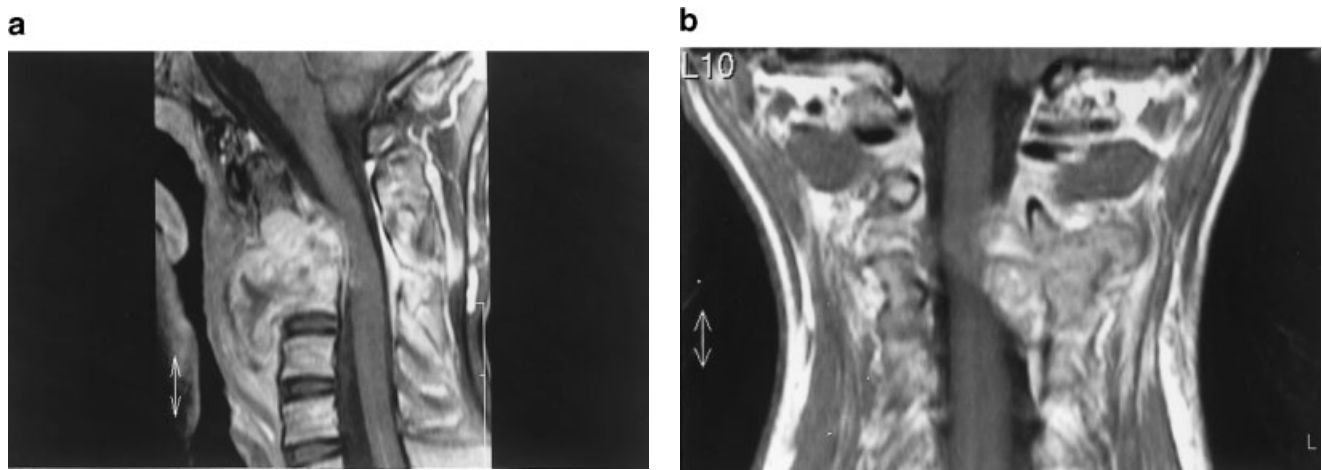
Histopathologic examination showed a pattern exactly like the previous examination. No sarcomatous zone was identified in this material.

#### Dominique Plantaz, MD (Pediatric Oncologist)

This extremely fast relapse with connective tissue infiltration was particularly feared because of its neurologic and visceral implications, even without osteosarcomatous transformation. Removal was impossible, so radiotherapy appeared to be the best treatment that could be proposed to this patient. The total dose could not be more than 46 Gray due to the presence of the cord. Moreover, irradiation alone was not always enough in a series of spinal GCT published by Boriani et al. [26] of the Instituto Rizzoli. They reported 2 recurrences after irradiation. There is not much in the literature concerning chemotherapy in GCT, usually considered a benign lesion. Chemotherapy has been used in rare cases of lung metastases, but without any mention of its efficacy [27–29]. In our patient, the fast progression of the tumor presented an argument for the use of antimetabolic agents, so we proposed chemotherapy.

#### Dr. Michalowski

The treatment chosen was cervical radiation therapy (46 Gray) and adjuvant chemotherapy based on the International Society of Pediatric Oncology protocol (MMT 95) for soft-tissue sarcomas. The regimen included cisplatin, ifosfamide, doxorubicin, etoposide, and vincristine (total of 6 courses). This patient had a good outcome with steady tumor regression.



**Fig. 3.** Gadolinium enhanced T1 weighted sagittal MRI of the cervical spine at relapse. Sagittal (a) and frontal (b) views: major relapse of the tumor with osteolysis from C2 to C4, spinal cord compression, extension into the retropharyngeal and cervical spaces.



**Fig. 4.** T1 weighted MRI of the cervical spine: 41 months follow-up. Sagittal view showing very good partial regression of the tumor with severe residual cervical kyphosis.

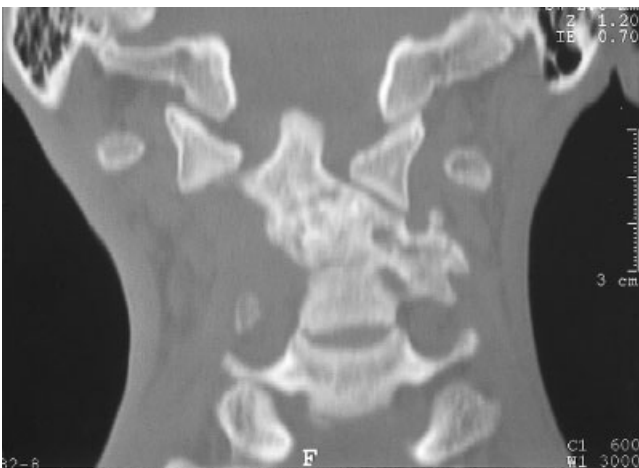
#### Dr. Nugues

In these recent images, we observe a total regression of the soft tissue invasion together with calcification and fusion of the vertebrae initially involved by the tumor (Figs. 4 and 5).

#### Dr. Michalowski

Forty-six months after his last intervention, the patient has neither clinical nor radiologic signs of relapse.

No intervention for cervical spine stabilization has been necessary, although some deformity is present and he wears a soft cervical collar.



**Fig. 5.** CT scan of cervical column (frontal views) showing bony reconstruction and deformities.

#### Dr. Plantaz

Giant cell tumors (GCT) of the cervical spine comprise a very rare and challenging group of tumors and treatment is complex. Radiotherapy of 40–46 Gray appears to be an effective treatment. We recommend radiotherapy after partial removal of recurrent tumors, if complete surgical removal cannot be achieved. New modalities of irradiation may help in this particular location. We cannot say what part chemotherapy played in our patient, but this treatment needs to be investigated, particularly when metastases or recurrent disease is present. Relapsed GCT treated with or without phenol therapy were evaluated by Trieb et al. [30]. In that study, adequate removal of the tumor in long bones seemed to be a more important predictive factor for outcome than the use of phenol as adjuvant therapy. Favorable results were reported in three consecutive patients with GCT of the spine treated with radiotherapy and biphosphonates as a new treatment option [31].

There is an obvious need for further study to improve our understanding of this complex tumor and its behavior, and to define the best multimodal therapy for the different sites in which it becomes manifest.

#### REFERENCES

- Schajowicz F, Sissons HA, Sobin LH. The World Health Organization's Histologic classification of bone tumors. A commentary on the second edition. *Cancer* 1995;75:1208–1214.
- Wulling M, Engels C, Jesse N, et al. The nature of giant cell tumor of bone. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:467–474.
- Goldring SR, Schiller AL, Mankin HJ, et al. Characterization of cells from human giant cell tumor of bone. *Clin Orthop* 1986;204:59–75.
- Goldring SR, Roelke MS, Petrisson KK, et al. Human giant cell tumors of bone. Identification and characterization of cell types. *J Clin Invest* 1987;79:483–491.
- Roessner A, Vassallo J, Vollmer E, et al. Biological characterization of human bone tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 1987;113:559–562.
- Kasahara K, Yamamuro T, Kasahara A. Giant cell tumor of bone: Cytological studies. *Br J Cancer* 1979;40:201–209.
- Zheng MH, Robbins P, Xu J, et al. The histogenesis of giant cell tumour of bone: A model of interaction between neoplastic cells and osteoclasts. *Histol Histopathol* 2001;16:297–307.
- Dahlin DG, Unni KK. Giant cell tumor (osteoclastoma). In: Thomas Charles C, editor. *Bone tumor—General aspects and data on 8542 cases*. Springfield: Charles C. Thomas Pub Ltd. 4th ed. 1986. 119 p.
- Barnes R. Giant-cell tumor of bone. *J Bone Joint Surg Br* 1972;54:213–215.
- Picci P, Manfrini M, Zucchi V, et al. Giant-cell tumor of bone in skeletally immature patients. *J Bone Surg (Am)* 1983;65:486–490.
- Kransdorf MJ, Sweet DE, Buetow PC, et al. Giant cell tumor in skeletally immature patients. *Radiology* 1992;184:233–237.
- Carrasco CH, Murray JA. Giant cell tumors. *Orthop Clin North Am* 1989;20:398–405.
- Levesque J, Marx R, Bell RS, et al. Giant cell tumor. In: *A clinical guide to primary bone tumors*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998. 148 p.
- Tomeno B, Forest M. Tumeurs à cellules géantes. In: *Expansion Scientifique Française editor. Cahiers d'enseignement de la*

- SOFCOT. Conférences d'enseignement. Paris: Expansion Scientifique Française edn. 1994. 31 p.
15. Forest M. Aspects anatomique des tumeurs à cellules géantes de l'os. *R Chir Orth* 1975;61:359–375.
  16. Sanjay BKS, Sim FH, Unni KK, et al. Giant cell tumours of the spine. *J Bone Joint Surg* 1993;75-B:148–154.
  17. Schajowicz F, Granato DB, McDonald DJ, et al. Clinical and radiological features of atypical giant cell tumors of bone. *Br J Radiol* 1991;64:877–889.
  18. Frassica FJ, Sanjay BK, Unni KK, et al. Benign giant cell tumor. *Orthopedics* 1993;16:1179–1183.
  19. Campanacci M, Baldini N, Boriani S, et al. Giant cell tumor of bone. *J Bone Joint Surg (Am)* 1987;69:106–114.
  20. Goldenberg RR, Campbell CJ, Bonfiglio M. Giant cell tumor of bone. *J Bone Joint Surg (Am)* 1970;52:619–664.
  21. Boquist L, Larsson SE, Lorentzon R. Genuine giant-cell tumour of bone: A combined cytological, histopathological, and ultrastructural study. *Pathol Eur* 1976;11:117–127.
  22. Shikata J, Yamamuro T, Shimizu K. Surgical treatment of giant-cell tumors of the spine. *Clin Orthop* 1992;278:29–36.
  23. Sharma RR, Mahapatra AK, Pawar SJ, et al. Craniospinal giant cell tumors: Clinicoradiological analysis in a series of 11 cases. *J Clin Neurosci* 2002;9(1):41–50.
  24. Turcotte RE, Biagini R, Sim FH, et al. Giant cell tumor of the spine and sacrum. *Chir Org Mov* 1990;75(suppl 1):104–107.
  25. Takayuki S, Norihiko T, Satoshi M, et al. Giant cell tumor in cervical spine. *Surg Neurol* 1985;23:148–152.
  26. Boriani S, Biagini R, Laus M, et al. Giant cell tumor of the vertebral column. *Chir Organi Mou* 1996;81:233–245.
  27. Goldenberg RR, Campbell CJ, Bonfiglio M. Giant cell tumor of bone: An analysis of 218 cases. *J Bone Joint Surg* 1970;52A:619–664.
  28. Bertoni F, Present D, Enneking WK. Giant cell tumor of bone with pulmonary metastases. *J Bone Joint Surg* 1985;67A:890–900.
  29. Siebenrock KA, Unni KK, Rock MG. Giant cell tumor of bone metastasizing to the lung: A long term follow-up. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80:43–47.
  30. Trieb K, Bitzan P, Lang S, et al. Recurrence of curetted and bone-grafted giant-cell tumours with and without adjuvant phenol therapy. *Eur J Surg Oncol* 2001;27:200–202.
  31. Fujimoto N, Nakagawa K, Seichi A, et al. A new bisphosphonate treatment option for giant cell tumors. *Oncol Rep* 2001;8:643–647.

## GUEST EDITOR'S NOTE

Grenoble, with a population of about 150,000 inhabitants, is the capital of the French Department Isère, and is a blend between the very ancient and the very new.

Grenoble, in the heart of the French Alps, has a fascinating history extending back to the 3rd Century B.C. It was always the center of commercial activity and a gathering place, since it boasts two rivers: the Isère, described as snake-like because it winds through the valley and is gray, the other, the Drac, (dragon) has waters that flow swift and clear. Today, walking through Grenoble, you notice circular brass disks embedded in the streets. These mark where the ancient Roman wall once defined the city, which is still encompassed by three giant mountains. Perhaps, the best known of these is the Chartreuse. Here Carthusian Monks in the 11th century formulated a pale green liqueur named Chartreuse that is still a favorite among connoisseurs.

As the birthplace of the writer Stendhal, the pen name of Marie Henri Beyle (1783–1842), and the city where many claim the French Revolution originated in 1788, Grenoble has a lively political, artistic, and cultural heritage. It is easy to see where the ancient and the modern merge. Many new buildings, including the Europole and the Synchrotron, are noteworthy, this not to mention the buildings constructed in 1968 when Grenoble was the site for the Winter Olympics. Many young people are in the city and many languages are spoken since students come from around the world to attend the University and enjoy mountain sports. Grenoble is now the second city in France to attract high tech industries, and is a great place to study the modern as well as the traditional sciences. The University is one of the oldest in France, founded in 1339 by Pope Benedict XII, after Montpellier (1180), Toulouse (1229), and Orléans (1306).

During the 15th and 16th centuries, Southeast France was regularly devastated by great plagues. These resulted in hospitals being built outside the town. Currently, the University Hospital Center carries on the medical traditions started so many centuries ago. It is able to accommodate more than 1,800 patients of whom more than 150 are children hospitalized for any medical or surgical problem, including pediatric oncology.

Contributed by  
Dr. Dominique Plantaz