

Université de Montréal

Étude de facteurs génétiques prédictifs dans le neuroblastome, en particulier les
anomalies du chromosome 14q

par

Marie-Pier Arsenault

Département de pathologie et biologie cellulaire
Faculté de médecine

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

Août 2010

© Marie-Pier Arsenault, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :
Étude de facteurs génétiques prédictifs dans le neuroblastome, en particulier les
anomalies du chromosome 14q

présenté par :
Marie-Pier Arsenault

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Frédérique Tihy
président-rapporteur

Hervé Sartelet
directeur de recherche

Raouf Fetni
codirecteur

Josée Lavoie
membre du jury

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS

Le neuroblastome (NB) représente 8% de tous les cancers pédiatriques et est caractérisé par sa grande hétérogénéité clinique. Afin d'évaluer son pronostic, plusieurs facteurs génétiques sont utilisés : amplification de *MYCN*, délétion 1p, gain 11q et gain 17q. Les buts de notre travail étaient d'abord de vérifier si l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permet une analyse complète de ces anomalies et ensuite, en utilisant une analyse globale du génome telle le polymorphisme nucléotidique simple (SNP), de vérifier la concordance avec les résultats de la FISH et le pronostic potentiel des anomalies du 14q, en particulier du gène *AKT*.

Nous avons donc établi un panel de sondes pour la FISH qui a été appliqué sur 16 tumeurs non-fixées. Après isolation de l'ADN de 36 tumeurs, nous avons effectué une analyse génotypique par SNP utilisant les puces « Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 » contenant 945,826 sondes non polymorphiques et 906,000 sondes polymorphiques.

Nos résultats ont démontré que la FISH permet l'évaluation complète des anomalies génétiques importantes du NB et que les anomalies déséquilibrées sont détectées très précisément par SNP. Les anomalies du 14q tendent à être associées avec des facteurs cliniques comme le grade et l'évolution, contrairement aux anomalies d'*AKT*. L'analyse du 14q a révélé trois gènes d'intérêt, *MAX*, *BCL11B* et *GPHN*, qui devraient être analysés sur un plus grand échantillon.

Ainsi, l'étude par FISH semble adaptée pour détecter les anomalies génétiques classiques du NB, alors que celles retrouvées en 14q représentent de potentielles cibles thérapeutiques pour cette tumeur.

Mots clés: Neuroblastome, FISH, SNP, 14q, *AKT*

SUMMARY AND KEY WORDS

Neuroblastoma (NB) accounts for 8% of all childhood cancers and is characterized by its clinical heterogeneity. To evaluate its prognostic, many genetic markers are used: *MYCN* amplification, 1p deletion, 11q gain and 17q gain. Our goals were first to verify if fluorescence *in situ* hybridization (FISH) allows a complete analysis of these abnormalities and, second, using a global genomic analysis as single nucleotide polymorphism (SNP), to verify the concordance with FISH results and the prognostic potential of 14q abnormalities, especially these of *AKT* gene.

We then established a FISH panel that has been applied on 16 unfixed tumors. After DNA isolation of 36 tumors, we made a genotypic analysis by SNP using « Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 » containing 945,826 non-polymorphic probes and 906,000 polymorphic probes.

Our results have demonstrated that FISH allows a complete evaluation of the NB's important genetic abnormalities and that unbalanced abnormalities are detected very precisely by SNP. 14q abnormalities seem to be associated with clinical factors such as tumor grading and evolution, unlike *AKT* abnormalities. Analysis of 14q abnormalities revealed three genes of interest, *MAX*, *BCL11B* and *GPHN*, which should be analyzed on a larger sample.

Thereby, FISH study seems appropriate to detect the NB's classic genetic abnormalities, while those found in 14q represent potential therapeutic targets for this tumor.

Keywords: Neuroblastoma, FISH, SNP, 14q, *AKT*

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS	i
SUMMARY AND KEY WORDS	ii
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	ix
REMERCIEMENTS.....	xi
INTRODUCTION	1
1. Le neuroblastome - Généralités	1
1.1 Origine du neuroblastome : les cellules de la crête neurale.....	1
1.2 Épidémiologie (fréquence, survie)	5
1.3 Hétérogénéité clinique.....	5
1.4 Diagnostic.....	6
1.5 Dépistage systématique	7
1.6 Traitement.....	8
2. Facteurs pronostiques	11
2.1 Facteurs pronostiques cliniques.....	11
2.1.1 Stade de la tumeur : Classification INSS	11
2.1.2 Âge au diagnostic.....	13
2.2 Facteurs pronostiques biologiques	13
2.2.1 Histologie	13
2.2.2 Marqueurs biologiques.....	16
2.2.3 Facteurs génétiques.....	16
3. L'apport de la génétique dans le neuroblastome.....	17
3.1 Les anomalies génétiques	17
3.1.1 Anomalie de nombre : La ploïdie	17
3.1.2 Anomalie de structure : Gain de matériel génétique.....	20
3.1.2.1 Amplification du gène <i>MYCN</i>	20
3.1.2.2 Gain du chromosome 17q.....	23
3.1.3 Anomalie de structure : Perte de matériel génétique	24
3.1.3.1 Délétion du chromosome 1p.....	24
3.1.3.2 Délétion du chromosome 11q.....	26
3.1.3.3 Autres (3p, ...).....	27
3.1.4 Perte d'hétérozygotie	27
LOH du chromosome 14q.....	28
3.2 État de la recherche	32
3.2.1 Division des neuroblastomes en deux profils distincts.....	32

3.2.2	Préciser la classification	33
3.2.3	Prévoir la progression : un modèle génétique.....	34
3.2.1	L'apport des techniques de pointe	35
4	Techniques utilisées pour la détection des anomalies génétiques	36
4.1	Cytogénétique standard.....	36
4.2	Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence.....	36
4.3	Cytométrie de flux.....	37
4.4	Hybridation génomique comparative	37
4.5	Polymorphisme nucléotidique simple.....	39
5	Hypothèses et buts.....	42
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		43
1.	Comité d'éthique.....	43
2.	Sélection des tumeurs	43
3.	FISH.....	44
3.1	Confection des lames	44
3.2	FISH interphasique	44
3.2.1	Pré-traitement	45
3.2.2	Dilutions et application des sondes	45
3.2.3	Lavage et coloration	47
3.3	Analyse : Décompte des sondes.....	47
3.4	Établir un panel	47
4.	SNP	48
4.1	Extraction d'ADN	48
4.2	Quantification et vérification de l'ADN	49
4.3	SNP	49
4.4	Analyse	54
4.5	Analyses statistiques	57
RÉSULTATS.....		58
1.	Données cliniques des tumeurs utilisées	58
2.	Zones d'empreinte sur les lames.....	60
3.	FISH - Établir le panel de sondes	61
4.	FISH - Résultats.....	64
5.	SNP - Résultats	66
5.1	Amplification	66
5.2	Gain	66
5.3	Délétion	66
5.4	CN-LOH.....	66
5.5	Ploïdie.....	67

6. Comparaison des résultats de la FISH et du SNP	71
7. SNP – Anomalies du 14q dans le neuroblastome	72
8. SNP - Gènes associés aux anomalies du 14q	79
9. SNP – Gène <i>AKT</i>	81
DISCUSSION	83
CONCLUSIONS	107
BIBLIOGRAPHIE.....	xi
APPENDICES.....	xxiii
Appendice 1 - Solutions	xxiii
Appendices 2 – Localisation des différentes sondes utilisées à la FISH	xxiv
Appendices 3 - Formulaire pour l’inscription du nombre de sondes lors de l’analyse	xxvi
Appendices 4 - Données cliniques individuelles pour les 40 patients dont les tumeurs ont été utilisées au FISH et/ou au SNP	xxvii
Appendices 5 – Pourcentage de noyaux ayant le plus grand nombre de signaux pour les principaux clones de toutes les combinaisons de sonde	xxviii
CURRICULUM VITAE.....	xxix

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I	PRISE EN CHARGE DES NEUROBLASTOMES DE RISQUE INTERMÉDIAIRE SELON LES CARACTÉRISTIQUES BIOLOGIQUES DÉFINIES PAR LE COG	9
TABLEAU II	CLASSIFICATION DES NEUROBLASTOMES SELON LES STADES INSS.....	12
TABLEAU III	SONDES UTILISÉES SUR NOYAUX INTERPHASIQUES EN FISH POUR VÉRIFIER LA PLOÏDIE ET LA PRÉSENCE D'ANOMALIES DANS LES CHROMOSOMES 1, 2, 11 ET 17.....	46
TABLEAU IV	RÉPARTITION DU NOMBRE DE TUMEURS SELON LE SEXE, LE STADE, L'ÂGE, LE STATUT DE <i>MYCN</i> ET L'ÉVOLUTION EN DATE DU MOIS D'AOÛT 2010...	58
TABLEAU V	NOMBRE DE SIGNAUX POUR CHAQUE SONDE UTILISÉE EN FISH AINSI QUE LA CONCLUSION SUGGÉRÉE PAR SES RÉSULTATS POUR LES 16 TUMEURS	65
TABLEAU VI	POURCENTAGES COMPARÉS ENTRE LES DONNÉES OBTENUES EN SNP ET LES DONNÉES DE LA LITTÉRATURE POUR LES ANOMALIES FRÉQUEMMENT RETROUVÉES DANS LE NEUROBLASTOME.....	69
TABLEAU VII	ANOMALIES RETROUVÉES EN SNP POUR <i>MYCN</i> AINSI QUE POUR LES RÉGIONS CHROMOSOMIQUES SUJETTES À DES ANOMALIES DE STRUCTURE DANS LE NEUROBLASTOME POUR LES 12 TUMEURS DE LA FISH	70
TABLEAU VIII	COMPARAISON DES CONCLUSIONS SUGGÉRÉES PAR LA FISH ET LE SNP	71
TABLEAU IX	ANOMALIES DU 14Q RETROUVÉES DANS LES 36 TUMEURS ANALYSÉES PAR SNP.....	74
TABLEAU X	NOMBRE DE TUMEURS AVEC ANOMALIES DES GÈNES <i>GPHN</i> , <i>BCL11B</i> ET <i>MAX</i> SELON LE STADE, L'ÂGE ET LE STATUT DE <i>MYCN</i>	80
TABLEAU XI	ANOMALIES TOUCHANT LE GÈNE <i>AKT</i>	82

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. FORMATION DE LA CRÊTE NEURALE.....	2
FIGURE 2. PRÉSENTATIONS CLINIQUES DU NEUROBLASTOME	4
FIGURE 3. CLASSIFICATION DES NEUROBLASTOMES EN HISTOLOGIE FAVORABLE OU NON FAVORABLE SELON LES DIFFÉRENTS CRITÈRES DE L'INPC.....	15
FIGURE 4. RÉSULTATS POSSIBLES D'UNE DIVISION TRIPOLAIRE D'UNE CELLULE TÉTRAPLOÏDE HÉTÉROZYGOTE POUR UN GST.....	19
FIGURE 5. AMPLIFICATION DU GÈNE <i>MYCN</i>	21
FIGURE 6. MÉCANISMES MITOTIQUES POUR LA FORMATION DE CN-LOH	28
FIGURE 7. VOIE DE SIGNALISATION PI3K/AKT ET SON IMPLICATION DANS LES PROCESSUS CELLULAIRES	31
FIGURE 8. MODÈLE HYPOTHÉTIQUE DE LA PROGRESSION DU NEUROBLASTOME.....	34
FIGURE 9. SCHÉMA D'UNE LAME SUR LAQUELLE ONT ÉTÉ APPOSÉES DES EMPREINTES.	44
FIGURE 10. PREMIÈRES ÉTAPES DU SNP : AMPLIFICATION DE L'ADN ET MARQUAGE... ..	50
FIGURE 11. HYBRIDATION DIFFÉRENTIELLE SELON LE GÉNOTYPE	51
FIGURE 12. DERNIÈRES ÉTAPES DU SNP : HYBRIDATION, COLORATION ET ANALYSE	53
FIGURE 13. INTERFACE PRINCIPAL DU LOGICIEL D'ANALYSE CHAS	55
FIGURE 14. RÉSULTATS DU SNP SOUS FORME DE NUAGES DE POINTS	56
FIGURE 15. REPRÉSENTATION DE CHAQUE STADE DANS L'ENSEMBLE DES TUMEURS UTILISÉES POUR LE SNP	59
FIGURE 16. SCHÉMA DES DIFFÉRENTES COMBINAISONS DE SONDAS EFFECTUÉES SUR LES ZONES D'EMPREINTES.....	61
FIGURE 17. HYBRIDATION <i>IN SITU</i> EN FLUORESCENCE DES SONDAS SÉLECTIONNÉES	63
FIGURE 18. EXEMPLE D'ANOMALIES RETROUVÉES AU SNP	68
FIGURE 19. RÉGIONS CHROMOSOMIQUES TOUCHÉES PAR LES ANOMALIES EN 14Q	75

FIGURE 20. ANOMALIES DU 14Q SELON LE GRADE DES TUMEURS.....	77
FIGURE 21. ANOMALIES DU 14Q SELON L'ÉVOLUTION DES PATIENTS.....	78
FIGURE 22. VARIATIONS OBSERVÉES AUTOUR DES GÈNES D'INTÉRÊT DU CHROMOSOME 14Q.....	79
FIGURE 23. ANOMALIES DU GÈNE <i>AKT</i> RETROUVÉES DANS 6 NEUROBLASTOMES	81
FIGURE 24. PERTE D'HÉTÉROZYGOTIE DU GÈNE <i>AKT</i> SELON LE GRADE DES TUMEURS..	82

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

BDNF : Brain-derived neurotrophic factor

CGH : Comparative Genomic Hybridization / Hybridation génomique comparative

ChAS : Chromosome Analysis Suite (logiciel)

CN-LOH : Copy Neutral Loss Of Heterozygosity / perte d'hétérozygotie à copie neutre

COG : Children's Oncology Group

CR : Complete Response / Réponse complète au traitement

DAPI : 4',6-diaminido-2-phénylindole

DM : Double minute

DOPA : Dopamine

EFS : Event-free survival / Survie sans évènement

FISH : Fluorescence *in situ* hybridization / Hybridation *in situ* en fluorescence

GN : Ganglioneurome

GNB : Ganglioneuroblastome

GST : gène suppresseur de tumeur

HLH : Helix-Loop-Helix / Hélice-boucle-hélice

HSR : Homogeneously Staining Region

HVA : Acides vanyllactique et homovanillique

INPC : International Neuroblastoma Pathology Classification

INRC : International Neuroblastoma Response Criteria

INRGSS : International Neuroblastoma Risk Group Staging System

INSS : International Neuroblastoma Staging System

kb : kilobase

LOH : Loss of Heterozygosity / Perte d'hétérozygotie

mb : mégabase

MKI : Mitosis-Karyorrhexis Index / Index mitose-caryorrexie

MR : Mixed Response / Réponse mixte au traitement

mRNA : Micro-RNA

NB : Neuroblastome

NGF : Neuronal growth factor

NR : Non response / Non-réponse au traitement

NSE : Neuron-specific-enolase

OS : Overall Survival / Survie globale (overall survival)

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction / Réaction en chaîne par polymérase

DP : Disease Progression / Progression de la maladie

PR : Partial Response / Réponse partielle au traitement

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism / Polymorphisme de longueur
des fragments de restriction

rpm : Rotation par minute

RTK : Récepteur tyrosine-kinase

SKY : Spectral karyotyping

SN : Système nerveux

SNP : Single Nucleotide Polymorphism / Polymorphisme nucléotidique simple

SSC : Saline-sodium citrate

TdT : Transférase déoxynucléotidyle terminale

VGPR : Very Good Partial Response / Très bonne réponse partielle au traitement

VMA : Vanylmandelic Acid / Acide vanylmandélique

REMERCIEMENTS

Merci à mon directeur, le Dr Hervé Sartelet, et à mon codirecteur, Dr Raouf Fetni, pour leur appui et leurs conseils.

Merci au Dre Carine Nyalendo et à Sonia Cournoyer pour leur temps et leur précieuse aide.

Merci à Mélanie Vachon et Louise Montreuil pour leur générosité et leur enseignement.

Merci au Dre Nicole Lemieux, à Fléchère Fortin, à Mélanie Beaulieu-Bergeron et à Van Thi Cam Pham pour leur encouragement et leur écoute. Mon cheminement en recherche n'aurait pas été le même sans vous.

Merci aux étudiants du département pour leur sens de l'humour, leur amitié et le tarot.

Merci à Marielle Chèvrefils, une technicienne passionnée, qui est véritablement au service des étudiants.

Merci au Département de pathologie et biologie cellulaire pour leur support financier.

Mon dernier remerciement, mais non le moindre, va à mes proches pour leur confiance et leur présence, autant dans les moments de découragement que de joie.

INTRODUCTION

1. LE NEUROBLASTOME - GÉNÉRALITÉS

Le neuroblastome (NB) est une tumeur pédiatrique maligne affectant principalement les jeunes enfants (âgés de 5 ans et moins dans 90% des cas). C'est une tumeur extra-cérébrale survenant dans les cellules qui engendrent normalement le système nerveux sympathique [98]. Il existe une forme familiale de NB qui est retrouvée chez à peine 1% des patients. Elle semble être autosomale dominante avec pénétrance incomplète [10]. Cependant, la grande majorité des cas de neuroblastomes sont sporadiques [50].

1.1 ORIGINE DU NEUROBLASTOME : LES CELLULES DE LA CRÊTE NEURALE

Au 19^e jour du développement embryonnaire, l'ectoderme se transforme en tube neural primitif. Quelques jours plus tard, des amas cellulaires se détachent du tube neural lorsqu'il se replie sur lui-même et représenteront la future crête neurale (figure 1). Ces cellules ont un grand potentiel migratoire et vont donc migrer vers de nombreux endroits du corps afin de donner naissance au système nerveux périphérique, c'est-à-dire les neurones et les cellules gliales des systèmes nerveux sympathique, parasympathique et sensoriel, ainsi qu'à certaines cellules non neuronales en périphérie du système nerveux telles les cellules de Schwann [113].

Les cellules de la crête neurale sont initialement des cellules souches pluripotentes, mais leur potentiel de différenciation se restreint avec le développement. Elles peuvent demeurer indifférenciées, elles sont alors appelées neuroblastes, ou se différencier en cellules ganglionnaires et en cellules de Schwann; elles sont alors considérées matures [10, 50]. Des cellules immatures imitant un neuroblastome d'un point de vue histologique peuvent être retrouvées dans les glandes surrénales de tous les fœtus normaux et chez quelques nouveaux-nés (fréquence estimée à 1/250) qui décèdent d'une autre cause. Toutefois, ces tumeurs *in situ* ont tendance à régresser spontanément [126].

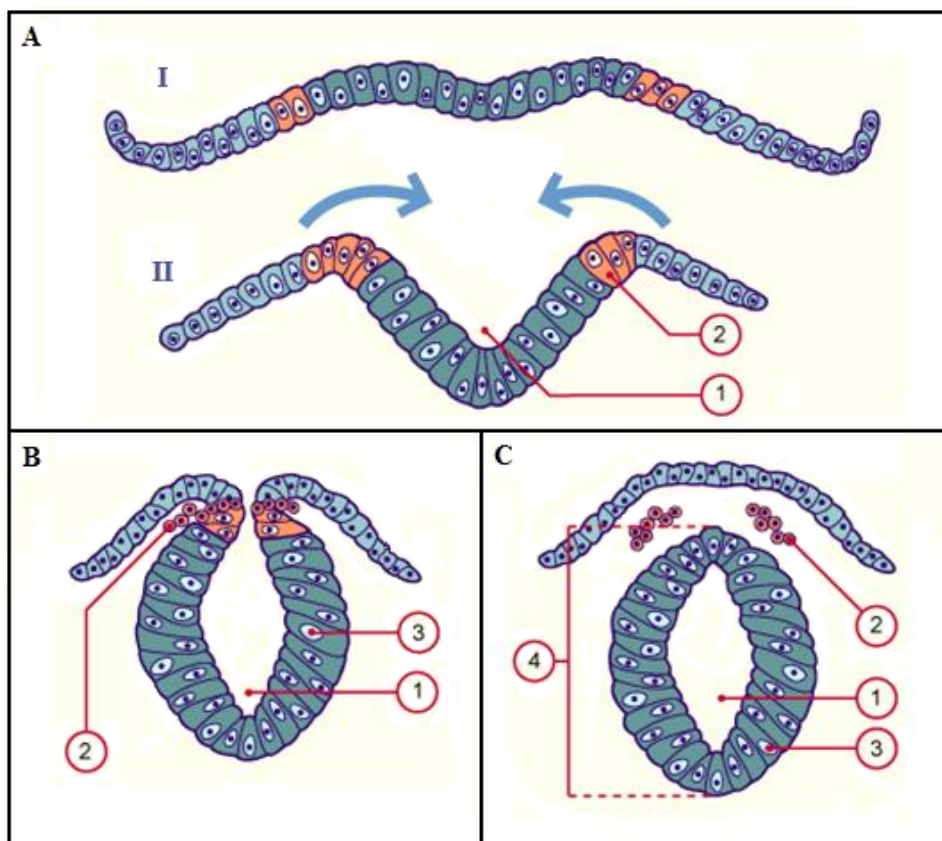


Figure 1. Formation de la crête neurale.

Lors du développement embryonnaire, la plaque neurale (AI) se replie sur elle-même (AII), les flèches en indiquent le sens. Il y a alors formation de la gouttière neurale (1) et les cellules orange (2), constituant les cellules de la crête neurale en devenir, commencent à se détacher (B, 2) du neuroépithélium (B, 3). La gouttière neurale devient alors le canal épendymaire (C, 1), alors que le tube neural est formé (C, 4) et que les cellules de la crête neurale sont prêtes à migrer (C, 2).

Adapté de <http://www.embryology.ch/index.html>.

Les cellules de la crête neurale peuvent subir une transformation maligne; il s'agit alors de tumeurs neuroblastiques, qui comprennent les tumeurs des ganglions du système nerveux sympathique et de la médullosurrénale. Certaines caractéristiques communes se retrouvent dans la famille des tumeurs neuroblastiques : la différenciation spontanée ou induite par thérapie des neuroblastes primitifs en éléments matures, la possibilité de régression spontanée et un vaste éventail de comportements cliniques et de pronostics.

Le neuroblastome (NB), tumeur maligne du système nerveux sympathique, est le membre le plus important de cette famille. Les tumeurs peuvent donc survenir tout au long du système nerveux (SN) sympathique, ce qui explique l'ancienne nomenclature du NB : le sympathoblastome. Toutefois, la plupart des tumeurs surviennent dans l'abdomen (65%), souvent dans la médullosurrénale (35%) (figure 2). Les autres vont se développer dans les ganglions sympathiques paraspinaux à différents sites, incluant le cou (5%), le torse (20%) et le pelvis (5%) [10, 50, 70]. Des localisations inhabituelles telles le thymus, le poumon, le rein, le médiastin antérieur, l'estomac et la cauda equida peuvent survenir.

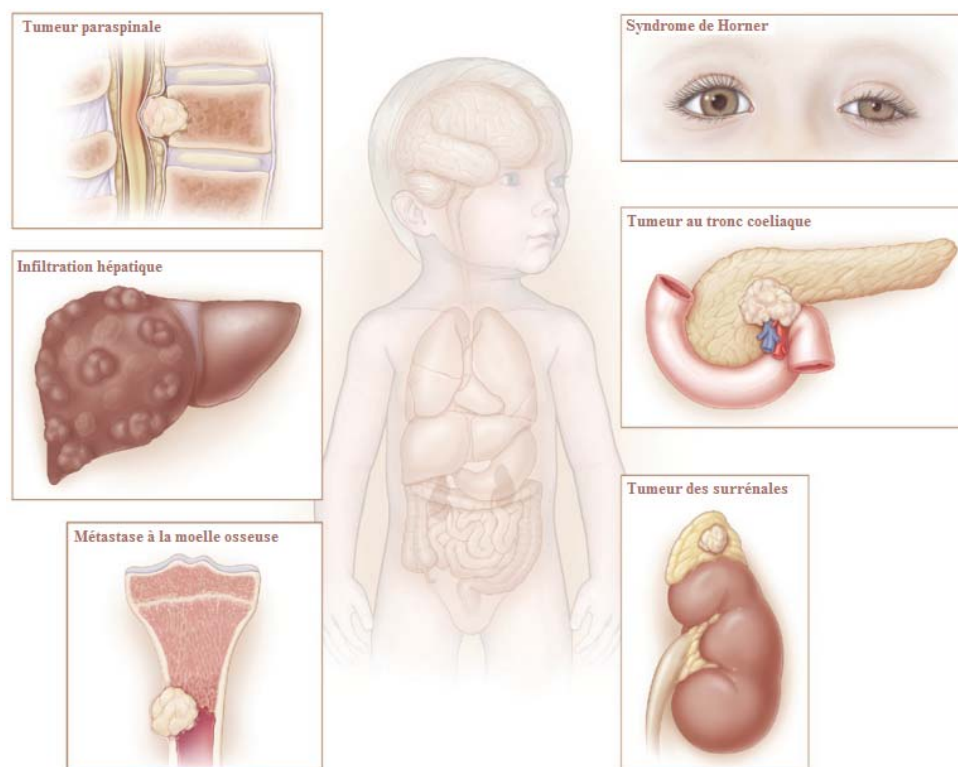


Figure 2. Présentations cliniques du neuroblastome

La majorité des NB sont localisés dans les surrénales, mais elles peuvent être partout dans le SN sympathique. Les tumeurs de haut grade peuvent infiltrer les structures environnantes, entourer les nerfs et les vaisseaux tels le tronc coeliaque et être difficilement opérables. Les NB au niveau de la colonne spinale peuvent causer le syndrome de Horner (triade ptose, myosis et anhidrose) par compression. Les métastases se retrouvent typiquement dans les ganglions lymphatiques et dans la moelle osseuse, ces dernières pouvant infiltrer l'os cortical, mais peuvent également se retrouver au foie.

Adapté de Maris, 2010.

1.2 ÉPIDÉMIOLOGIE (FRÉQUENCE, SURVIE)

Chaque année au Canada, environ 850 enfants reçoivent un diagnostic de cancer entre la naissance et l'âge de 14 ans. L'incidence est généralement la plus élevée lors des cinq premières années de vie. Le NB est la tumeur la plus fréquente chez les enfants de moins d'un an et représente entre 7-10% de tous les cancers pédiatriques [10, 31, 47]. Il est par ailleurs la tumeur solide extra-crânienne la plus fréquente chez l'enfant et contribue de façon disproportionnée à la mortalité infantile par cancer, causant 15% des décès dans cette jeune population [25, 65, 91]. Chaque année, 295 nouveaux cas surviennent au Canada. L'incidence semble uniforme à travers le monde, sans différence selon l'origine ethnique, et est estimée annuellement à 8 cas par million chez les enfants de moins de 15 ans. L'âge moyen au diagnostic est de 18 mois; environ 40% des patients sont diagnostiqués avant 1 an, 75% avant 4 ans, 90% avant 5 ans (ce qui caractérise les tumeurs embryonnaires) et 98% avant l'âge de 10 ans. Par ailleurs, aucun facteur de risque majeur n'a été identifié [10, 31, 47, 91, 123]. Il pourrait toutefois y avoir une association entre le NB et certaines malformations congénitales chez les enfants de moins d'un an [10], telles la neurofibromatose de type I [41] ou la maladie de Hirschsprung [81].

1.3 HÉTÉROGÉNÉITÉ CLINIQUE

Le neuroblastome se distingue par sa grande hétérogénéité clinique. En effet, il peut avoir trois comportements cliniques distincts : une progression mettant la vie en danger, une maturation (en ganglioneurome, la tumeur bénigne correspondante) ou une régression spontanée. Ces tumeurs régressant spontanément sont de 10 à 100 fois plus nombreuses dans le neuroblastome que pour tout autre cancer chez l'humain. Ce type de régression spontanée survient essentiellement chez les patients ayant un stade 4s [91] (pour plus d'information concernant le stade 4s, voir la section 2.1.1).

Chez les enfants de plus d'un an, 75% des NB surviennent sous forme métastatique; les tumeurs sont agressives et sont résistantes à la chimiothérapie, ce qui complique considérablement le traitement. Malgré ce large éventail d'agressivité, l'évolution de

la tumeur peut dans une certaine mesure être anticipée par le stade de l'extension tumorale (voir la section histologie) et l'âge au diagnostic [7, 91, 123].

Chez les patients atteints de NB métastatiques, environ 1% des tumeurs primaires ne seront pas retrouvées. Le site le plus commun des métastases est l'os, observé chez 40 à 60% des patients au diagnostic. Quant aux métastases de la moelle osseuse, deux formes peuvent être observées : diffus et nodulaire. La forme nodulaire a un meilleur pronostic, avec une fréquence basse de métastases corticales co-existantes et une excellente réponse à la chimiothérapie. La forme diffuse est presque toujours observée avec métastases corticales, répond moins à la chimiothérapie et a un mauvais pronostic. Les métastases hépatiques sont aussi communes et peuvent aussi être retrouvées sous forme diffuse ou nodulaire. L'ensemble des symptômes causé par un développement de nombreuses métastases au foie a été appelé Syndrome de Pepper. Les métastases de la peau peuvent aussi se retrouver relativement fréquemment, spécialement chez les enfants âgés de moins d'un an, et peuvent apparaître comme des masses bleues ou mauves foncées ressemblant à des bleuets, d'où l'appellation du syndrome « blueberry muffin ». Moins communs, les autres sites de métastases incluent la dure-mère, les poumons et le cerveau, bien que presque tous les organes aient été documentés comme site de métastases dans le neuroblastome [47, 65].

1.4 DIAGNOSTIC

Le diagnostic du NB est basé sur la présence de traits histopathologiques caractéristiques au tissu tumoral (voir section histologie) ou la présence de cellules tumorales dans la biopsie ou l'aspiration de la moelle osseuse, accompagnée par une augmentation de la concentration urinaire des catécholamines [73].

Le dosage fractionné des catécholamines, synthétisées à partir de la tyrosine, permet d'analyser différents métabolites qui informent sur le stade de développement du neuroblastome. En effet, les neuroblastomes de haut grade, ou indifférenciés, se

caractérisent par un déficit en dopamine-bêta hydroxylase, dont l'activité est nécessaire pour convertir la dopamine en noradrénaline. Ce déficit entraîne une accumulation de dopamine (DOPA) et donc une excrétion urinaire élevée en DOPA et acides vanyllactique et homovanillique (HVA) et une excrétion moindre en acide vanylmandélique (VMA). Lorsque la présence d'un neuroblastome est suspectée, il y a donc dosage de la dopamine, des HVA ainsi que de la VMA, un métabolite de la noradrénaline. Ainsi, il est possible de calculer le rapport VMA/HVA, dont un résultat plus bas que la normale peut indiquer la présence d'un neuroblastome indifférencié [91, 126].

1.5 DÉPISTAGE SYSTÉMATIQUE

L'incidence élevée des neuroblastomes, leur survenue précoce, leur pronostic plus favorable avant l'âge d'un an et l'existence d'un marqueur urinaire (les catécholamines) permettent leur diagnostic avec de bonnes sensibilité et spécificité plaçant pour un diagnostic précoce de ces tumeurs. La première observation des programmes de dépistage menés au Japon, au Québec et en Allemagne a été une augmentation de l'incidence des NB sans diminution de la mortalité. Bref, les NB identifiés par un dépistage systématique évoluaient favorablement. La pratique du dépistage systématique a donc conduit à une surévaluation du nombre de tumeurs qui étaient destinées à régresser spontanément. Le patient pourrait recevoir un traitement non nécessaire et par conséquent une toxicité inutile. Ainsi, il a été conclu que le dépistage systématique ne pouvait pas être recommandé en termes de santé publique [50, 91].

Le dépistage systématique a cependant aidé à établir deux profils de neuroblastomes biologiquement distincts : le premier avec caractéristiques biologiques favorables, pouvant même régresser spontanément, asymptomatique, survenant avant l'âge d'un an et détectable au dépistage alors que le second est défavorable, symptomatique, survenant après l'âge d'un an et non détecté par le dépistage systématique.

1.6 TRAITEMENT

Le traitement du neuroblastome peut combiner la chimiothérapie et la chirurgie, parfois même la radiothérapie. Ce sont des thérapies lourdes dont les risques de toxicité et de séquelles doivent être pris en considération. La grande variabilité clinique est prise en compte lors de l'établissement de la stratégie thérapeutique. Pour se faire, la plupart des centres utilisent une stratification selon les groupes de risque [66, 91]. Les groupes de risque sont établis selon différents facteurs pronostics par le Children's Oncology Group (COG). Auparavant, les facteurs de risque pris en considération comprenaient le stade INSS, l'âge au diagnostic, l'histologie, la ploïdie et l'amplification de *MYCN*. Depuis quelques années, la délétion 1p et la délétion 11q sont également pris en considération par le COG. Il existe trois groupes de risque : faible, intermédiaire et élevé.

Pour les neuroblastomes de risque faible, le traitement est habituellement limité à l'observation ou à l'exérèse chirurgicale. Puisqu'ils ont tendance à régresser spontanément, les stades 4s ne requièrent pas de traitement sauf s'il y a progression tumorale ou menace vitale, mais ils sont étroitement surveillés.

En ce qui à trait aux neuroblastomes de risque intermédiaire, la stratégie est guidée par l'évolution clinique et anatomique de la tumeur, pouvant nécessiter une chimiothérapie à dose minimale efficace puis un traitement chirurgical. En fait, ce groupe de neuroblastomes est le plus hétérogène et dont l'évolution est la plus variable. Les nouveaux facteurs pronostics pris en considération tels le 1p et le 11q amènent alors une distinction importante (tableau II).

Pour les 40% de patients dans la catégorie des risques élevés, les améliorations thérapeutiques des vingt dernières années n'ont amélioré que faiblement leur chance de survie. La stratégie thérapeutique actuelle combine la chimiothérapie néo-adjuvante, la chirurgie, la chimiothérapie myélo-ablative avec thérapie cellulaire et la radiothérapie [91].

Tableau I Prise en charge des neuroblastomes de risque intermédiaire selon les caractéristiques biologiques définies par le COG

Stade INSS	Âge au diagnostic	Caractéristiques biologiques	Chimiothérapie (nombre de cycles)
3	< 365 jours	MYCN na, HF, DI>1 LOH 1p et/ou LOH 11q	4
3	< 365 jours	MYCN na, HNF et/ou DI=1 1p et 11q normaux	8
3	< 365 jours	MYCN na, HNF et/ou DI=1 LOH 1p et/ou LOH 11q	8
4	< 365 jours	MYCN na, HF, DI>1 1p et 11q normaux	4
4	< 365 jours	MYCN na, HNF et/ou DI=1 Peu importe le statut 1p/11q	8
4	< 365 jours	MYCN na, HF, DI>1 LOH 1p et/ou LOH 11q	4

Chez des patients âgés de moins de 365 jours qui ont un NB de stade 3 ou 4 qui ne possède pas l'amplification de *MYCN*, le nombre de cycles de chimiothérapie sera dicté selon l'histologie, la ploïdie et la perte d'hétérozygotie du 1p et/ou du 11q. HF = histologie favorable, HNF = histologie non favorable, DI = index d'ADN.
Adapté du Children's Oncology Group (COG).

La réponse au traitement est classifiée selon l'« International Neuroblastoma Response Criteria » (INRC). Une réponse complète (CR) indique une disparition totale de toutes les tumeurs primaires et les métastases et la normalisation des catécholamines et des métabolites (s'il y avait eu augmentation). Une très bonne réponse partielle (VGPR) indique une réduction du volume de la tumeur primaire à 90-99% avec disparition de toutes les métastases et normalisation des catécholamines. Une réponse partielle (PR) indique une diminution du volume de la tumeur primaire de plus de 50% et une diminution de plus de 50% de tous les sites métastatiques. Une réponse mixte (MR) indique une réponse de plus de 50% à certains sites, alors que d'autres ont une réduction de volume de moins de 50%. Une non-réponse (NR) indique une réduction de moins de 50% de tous les sites, mais pas d'augmentation supérieure à 25% dans ces lésions et pas de nouvelles lésions visibles. Finalement, une progression (DP) indique une augmentation de plus de 25% du volume d'une lésion préexistante ou d'une nouvelle lésion [13].

Malgré les traitements actuels, le taux de mortalité relié au neuroblastome demeure élevé, ce qui pousse la recherche vers de nouvelles options thérapeutiques. Puisque les gènes, les protéines et les voies importantes dans la pathogénèse des neuroblastomes sont actuellement sous projet de recherche, il est à prévoir qu'ils fourniront des indices pour le développement d'un traitement davantage basé sur la biologie des tumeurs. Ce type de traitement est attrayant, puisqu'il fournit une approche relativement unique au neuroblastome, avec une plus grande spécificité et une toxicité plus faible que les traitements actuels [10, 123].

2. FACTEURS PRONOSTIQUES

Le pronostic d'un neuroblastome est très variable et plusieurs facteurs entrent en ligne de compte pour le déterminer. Il est notamment établi selon des facteurs cliniques, tels le stade d'extension de la maladie (stade INSS) et l'âge de l'enfant au diagnostic, ainsi que par des facteurs biologiques (histologie et marqueurs) et des facteurs cytogénétiques [50, 91].

Les chances de guérison diffèrent largement dans le neuroblastome. En effet, un enfant atteint d'un NB de **pronostic favorable**, comprenant les tumeurs de stades 1, 2 et 4s sans amplification de *MYCN*, a une chance de guérison supérieure à 80%, tandis que celui atteint d'un neuroblastome de **pronostic sévère**, c'est-à-dire âgé de plus de 18 mois avec un stade 4 ou âgé de moins de 18 mois avec amplification de *MYCN* (stade 3 ou 4), a moins de 30% de chances de guérir. En englobant tous les stades de neuroblastome, le taux de survie à 5 ans était à 72% seulement entre 2000 et 2004 au Canada [31, 91].

2.1 FACTEURS PRONOSTIQUES CLINIQUES

2.1.1 STADE DE LA TUMEUR : CLASSIFICATION INSS

La classification INSS (International Neuroblastoma Staging System), émergée d'un consensus international, a été publiée en 1988 et révisée en 1993. Elle prend en considération les caractéristiques cliniques, radiologiques, chirurgicales et pathologiques de la tumeur. La classification INSS divise les neuroblastomes en 5 stades numérotés de 1 à 4 en plus d'un stade 4s (tableau I). La mise en évidence de métastases et leurs localisations est un critère majeur dans la classification du neuroblastome. En effet, dès qu'une métastase est découverte, la tumeur est classée stade 4, excepté si les métastases sont confinées à la peau, au foie et à la moelle, dans ce cas, la tumeur est classée 4s [89, 91].

Tableau II Classification des neuroblastomes selon les stades INSS

Stade INSS	Description
1	Tumeur localisée, restreinte au site d'origine, exérèse macroscopiquement complète, avec ou sans résidu microscopique. Ganglions lymphatiques homolatéraux représentatifs histologiquement négatifs.
2a	Tumeur localisée avec exérèse macroscopiquement incomplète. Ganglions ipsi et controlatéraux représentatifs non envahis.
2b	Tumeur localisée avec ou sans exérèse macroscopiquement complète avec des ganglions lymphatiques ipsilatéraux envahis. Les ganglions controlatéraux doivent être microscopiquement négatifs.
3	Tumeur unilatérale non réséquable dépassant la ligne médiane avec ou sans envahissement ganglionnaire régional. Tumeur localisée unilatérale avec ganglions lymphatiques controlatéraux envahis. Tumeur dépassant la ligne médiane avec extension bilatérale (non réséquable) ou ganglions controlatéraux envahis.
4	Extension métastatique tumorale à des ganglions lymphatiques à distance, l'os, la moelle osseuse, le foie, la peau et/ou d'autres organes (à l'exception de ceux définis au stade 4s).
4s	Tumeur localisée (comme défini par les stades 1, 2a ou 2b), avec extension métastatique limitée au foie, à la peau ou à la moelle osseuse (<10% de la tumeur) chez des enfants de moins d'un an.

Les tumeurs 1, 2 et 3 sont localisées et non métastatiques, mais ont divers degrés d'extension tumorale (de aucune à dépassant la ligne médiane) alors que les stades 4 et 4s sont métastatiques, mais le stade 4s a des sites métastatiques limités à des endroits spécifiques.

Adapté de Brodeur, JCO, 1993.

Tout récemment, un nouveau système de classification a émergé de l'INRGSS (International Neuroblastoma Risk Group Staging System), qui classifie le neuroblastome en 4 stades : L1 (maladie localisée sans facteurs de risque définis par image [image-defined risk factor]), L2 (maladie localisée avec facteurs de risque définis par image), M (tumeur métastatique) et Ms (tumeur métastatique avec métastases définies à la peau, au foie et/ou à la moelle osseuse chez des enfants de moins de 18 mois) [26, 50, 80]. Cependant, la classification INSS demeure la plus utilisée et le sera dans ce mémoire.

La relation entre les différents stades n'est pas bien comprise actuellement et a même déjà mené certains auteurs à suggérer que le neuroblastome n'est pas une seule maladie, mais inclus plutôt un spectre de maladies inter reliées [25].

En clinique, les termes bas grade et haut grade sont parfois utilisés pour désigner une tumeur. Une tumeur de bas grade est non métastatique, de stade 1 ou 2, alors qu'une tumeur de haut grade est métastatique, de stade 3 ou 4. Les stades 4s sont exclus, puisqu'ils sont métastatiques, mais de bon pronostic.

2.1.2 ÂGE AU DIAGNOSTIC

Dès 1971, une différence entre les patients dont l'âge au diagnostic était plus ou moins élevé a été remarquée comme influençant le comportement tumoral [9]. Depuis ce temps, l'âge est une variable dichotomique dans le neuroblastome, l'âge de moins de 12 mois étant considéré comme un bon pronostic par rapport à 12 mois et plus qui signe un mauvais pronostic. Cependant, les dernières études sur ce facteur pronostic penchent plutôt vers une limite d'âge supérieure à 12 mois [64, 99]. En effet, ces études démontrent que les patients âgés de 12 à 18 mois ont un aussi bon pronostic que ceux âgés de moins de 12 mois, alors que ceux âgés de 18 à 24 mois ont un pronostic équivalent à ceux de 24 mois et plus. Le Children's Oncology Group (COG) a donc proposé l'âge de 18 mois comme limite d'âge pour ce facteur pronostic dans le NB [99]. Cependant, cette nouvelle limite est encore controversée et l'âge au diagnostic demeure, en général, 12 mois.

2.2 FACTEURS PRONOSTIQUES BIOLOGIQUES

2.2.1 HISTOLOGIE

L'histologie a une grande importance dans le pronostic du neuroblastome, puisqu'il existe un vaste spectre de tumeurs, autant bénignes que malignes et très agressives. Afin d'avoir une homogénéité pour la stratification histologique, la classification qui a longtemps été utilisée à l'échelle internationale avait été proposée par Shimada en 1984 [103]. Toutefois, cette classification a été révisée par l'International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) et, bien que la classification Shimada soit encore utilisée, l'INPC est devenue la référence [93, 102]. Elle distingue les tumeurs à histologie favorable des tumeurs à histologie non favorable non seulement par les caractéristiques histologiques (développement du stroma

schwannien, différenciation neuroblastique), mais également par l'âge des patients et l'index mitose-caryorrexie (MKI), défini comme le pourcentage de cellules en division (mitose) et/ou ayant du matériel nucléaire condensé et fragmenté (caryorrhexie). Ainsi, elle peut distinguer 4 catégories morphologiques de base (figure 3) : le ganglioneurome (GN), le ganglioneuroblastome mélangé, le ganglioneuroblastome nodulaire et le NB [50, 88, 93].

La première distinction entre les tumeurs se situe au niveau de leur contenu cellulaire. Le GN est composé uniquement de cellules matures ganglionnaires et de cellules de Schwann et est considéré bénin. Au contraire, une tumeur composée principalement de neuroblastes (cellules indifférenciées) est appelée neuroblastome. Trois types de neuroblastomes sont retrouvés selon le pourcentage de neuroblastes en voie de différenciation de la tumeur : indifférenciés (0%), pauvrement différenciés (<5%) et différenciés (>5%). Finalement, une tumeur comprenant des cellules matures et des neuroblastes en différenciation et qui est composé de plus de 50% de stroma schwannien est un ganglioneuroblastome (GNB). La présence de tissu immature dans le NB et le GNB indique l'agressivité ou le potentiel agressif de la tumeur. Les GNB, représentant 15% des tumeurs neuroblastiques, sont des tumeurs potentiellement malignes, quoi qu'ils n'aient pas d'amplification *MYCN* et ont un meilleur pronostic que le NB indifférenciés. Il existe deux types de GNB distincts : la forme nodulaire, qui est définie par la présence de nodules de neuroblastes visibles macroscopiquement, et la forme mélangée, qui contient de petits îlots de neuroblastes dans un stroma abondant. Le terme neuroblastome est souvent utilisé pour désigner l'ensemble des tumeurs neuroblastiques malignes (NB et GNB) [65, 88, 89, 91]. Après avoir classifié les tumeurs selon le type de cellules qu'elles contiennent, l'INPC fait une autre stratification des tumeurs selon leur MKI et l'âge au diagnostic. Le groupe à histologie défavorable inclut les tumeurs indifférenciées ou avec un MKI élevé à tout âge, les tumeurs pauvrement différenciées ou avec un MKI intermédiaire chez les patients âgés de plus de 18 mois et les tumeurs différenciées ou MKI bas après 60 mois. Le groupe à histologie favorable comprend tous les autres cas, ainsi que les GN [50, 88].

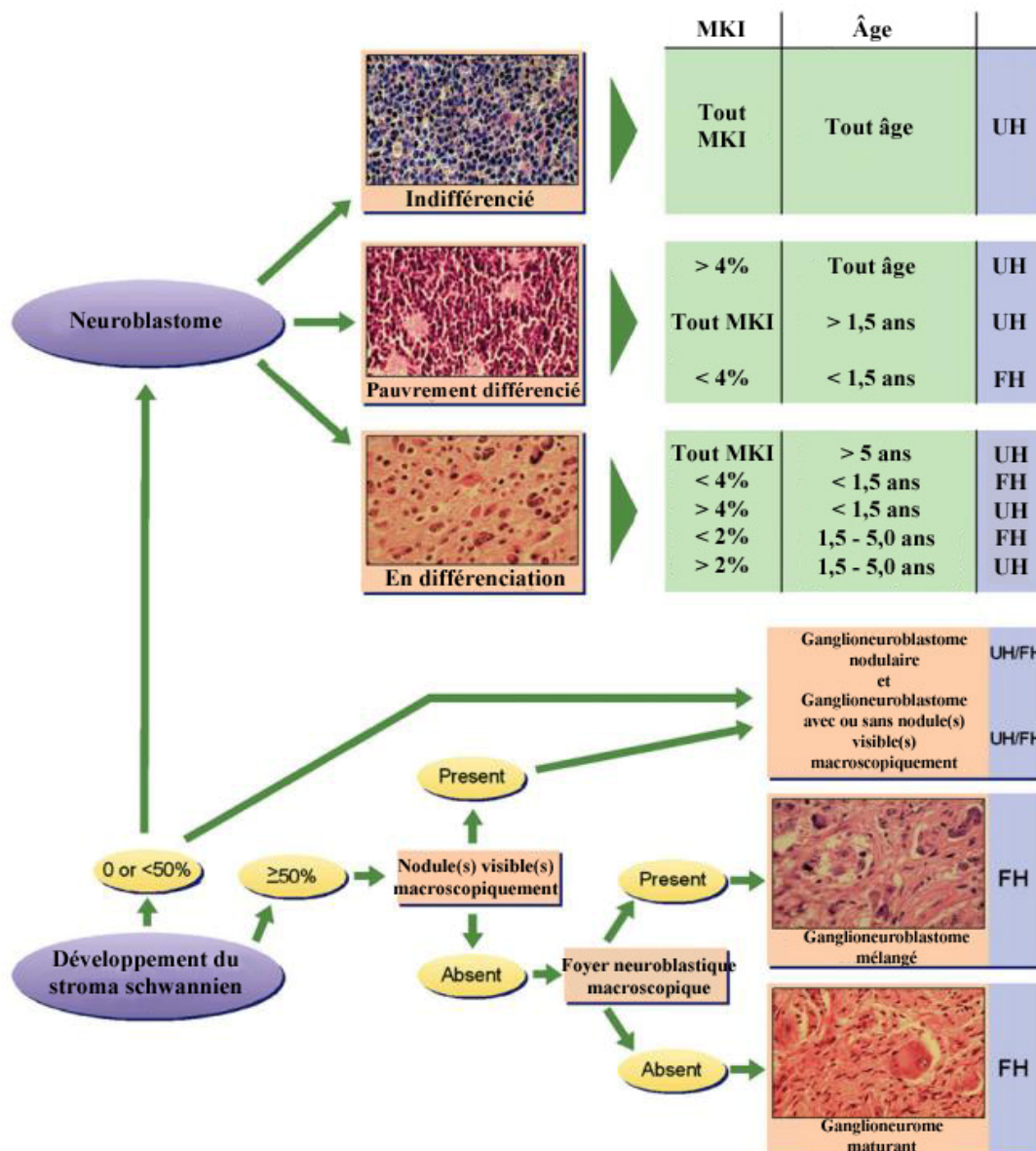


Figure 3. Classification des neuroblastomes en histologie favorable ou non favorable selon les différents critères de l'INPC

Le premier critère à déterminer est le pourcentage de développement du stroma schwannien. Le second est le niveau de différenciation des neuroblastes. Finalement, l'index mitose-caryorexie est évalué. MKI= index mitose-caryorexie, FH = histologie favorable, UH = histologie non favorable.

Adapté de Park, 2010.

2.2.2 MARQUEURS BIOLOGIQUES

Les neurotrophines (NGF et BDNF) interviennent au cours du développement du SN central par l'intermédiaire de récepteurs à tyrosine kinase Trk (Trk-A et Trk-B). L'expression différentielle des récepteurs Trk est étroitement associée aux caractéristiques évolutives des neuroblastomes : un niveau d'expression élevé de Trk-A est spécifiquement observé dans les neuroblastomes de bas grade et sans amplification de *MYCN*, alors qu'un niveau d'expression élevé de Trk-B est retrouvé dans les neuroblastomes de haut grade ou avec amplification de *MYCN* [91].

De nombreux marqueurs moléculaires ou géniques ont suggéré une valeur prédictive dans le neuroblastome et ce, dans la résistance aux chimiothérapies (Multi-drug resistance protein), la viabilité des cellules neuroblastiques (télomérase), le contrôle de l'apoptose, la différenciation et le contrôle du potentiel métastatique [91].

2.2.3 FACTEURS GÉNÉTIQUES

Le caractère imparfait des données anatomiques et cliniques a mené à la recherche de marqueurs biologiques plus précis pour le pronostic du neuroblastome, en particulier les facteurs génétiques, qui font l'objet du chapitre suivant.

3. L'APPORT DE LA GÉNÉTIQUE DANS LE NEUROBLASTOME

Depuis une vingtaine d'années, l'analyse moléculaire des neuroblastomes a permis d'identifier plusieurs anomalies génétiques qui sous-tendent la variabilité clinique de cette tumeur. Cependant, aucune de ces anomalies clonales n'est spécifique ni n'est présente dans la totalité des neuroblastomes. Les progrès dans la compréhension de la biologie et la génétique du neuroblastome ouvrent la voie à l'identification des caractéristiques différentielles entre un patient à pronostic favorable et défavorable pour lesquels peuvent être proposés des traitements plus adaptés, voire éventuellement ciblés à leurs anomalies spécifiques [91].

3.1 LES ANOMALIES GÉNÉTIQUES

Au début des années 1980, l'étude des caryotypes a démontré l'existence d'anomalies chromosomiques récurrentes dans les tumeurs solides, contrastant avec les altérations spécifiques retrouvées dans les hémopathies malignes [10]. Le neuroblastome fait partie de ces tumeurs solides, dont la première anomalie parue dans la littérature est la délétion du bras court du chromosome 1 (1p) en 1977 et 1981 [12, 15]. Elle est suivie par l'amplification de l'oncogène *MYCN* dans les lignées cellulaires en 1983 [100], qui sera retrouvée dans les tumeurs et liée à un mauvais pronostic dans les années qui suivirent [14, 101]. Simultanément, en 1984, les anomalies au niveau des bras longs du chromosome 17 (17q) sont identifiées [42]. En 1987, une distinction dans la survie des patients selon la ploïdie de la tumeur est soulevée [53]. En 1989, la perte d'hétérozygotie (LOH) au niveau des bras long du chromosome 14 (14q) ressort comme anomalie récurrente dans le neuroblastome [106], suivi en 1993 par la délétion au niveau des bras longs du chromosome 11 (11q) [105].

3.1.1 ANOMALIE DE NOMBRE : LA PLOÏDIE

Les anomalies numériques des chromosomes sont la perte ou le gain d'un ou plusieurs chromosomes entiers, menant à des variations de la ploïdie. La ploïdie est considérée comme un facteur important pour le pronostic du NB puisque des études ont démontré une différence marquée entre les tumeurs diploïdes ou tétraploïdes et

les tumeurs triploïdes. En effet, l'hyperdiploïdie (51-57 chromosomes) ou la triploïdie (58-80 chromosomes) est essentiellement observée dans les NB survenant chez les enfants de moins d'un an et d'évolution favorable. Ces tumeurs forment peu de métastases et ont tendance à devenir mature ou à régresser spontanément. Le caractère diploïde (44-50 chromosomes) ou tétraploïde (81-103 chromosomes) des cellules du neuroblastome est au contraire associé à une diminution de la survie (globale et sans évènement) indépendamment de l'âge et du stade d'extension du NB. Plus de 50% de ces tumeurs sont déjà métastatiques au diagnostic et une régression est très rarement, si jamais, observée. D'autre part, les tumeurs triploïdes sont rarement associées à des anomalies de structure, alors que les tumeurs diploïdes ont une haute fréquence d'anomalies structurelles. Bien que cette variation dans le nombre de chromosomes puisse s'expliquer par une incapacité des chromosomes à subir une ségrégation adéquate lors de la mitose (par exemple, par un problème au niveau du fuseau mitotique), les causes moléculaires exactes demeurent inconnues [6, 50, 91, 104].

La raison de ces différences entre les tumeurs triploïdes et diploïdes n'est pas sujette à un consensus dans la littérature. Les conséquences cliniques très différentes de ces deux types de tumeurs impliquent peut-être que les tumeurs triploïdes « précoces » évoluent suite à une erreur développementale plutôt que d'un mécanisme classique de transformation tumorale. Une seconde hypothèse soutient que l'évolution favorable des NB triploïdes est plutôt la conséquence d'une faible présence d'autres altérations chromosomiques dans ces tumeurs par rapport à une présence plus élevée dans les tumeurs di ou tétraploïdes. La raison de cette différence du nombre d'anomalies serait associée à l'origine des cellules tumorales. Selon Kaneko (2000), les cellules tumorales ayant une ploïdie augmentée dériveraient toutes d'une cellule tétraploïde formée directement (par endoduplication ou endomitose) d'une cellule diploïde ayant un premier évènement génétique la prédisposant à devenir tumorale, par exemple une hétérozygotie pour un GST. La cellule tétraploïde résultante aurait deux copies mutantes et deux copies normales du gène critique. Dans un cycle mitotique subséquent, ces cellules tétraploïdes peuvent subir une division bipolaire, tétrapolaire

ou tripolaire. Une division bipolaire entraînerait deux cellules tétraploïdes avec deux gènes mutants et deux gènes normaux, alors qu'une division tétrapolaire donnerait quatre cellules diploïdes pour lesquelles deux scénarios sont possibles : soit les quatre cellules-filles sont hétérozygotes pour le gène mutant ou soit deux cellules sont hétérozygotes, une homozygote normale et l'autre homozygote mutante. De telles cellules mutantes pour un GST peuvent montrer une absence d'un programme de sélection naturelle et, quoiqu'elles puissent ne pas être plus malignes à ce stade, elles vont accumuler des anomalies qui augmentent le taux de croissance des cellules, ainsi que leur capacité à métastaser, ce qui caractérise les tumeurs à évolution défavorable. Quant à la division tripolaire, elle mènerait à la production de deux cellules triploïdes et une cellule diploïde pour lesquelles plusieurs possibilités sont à envisager (figure 4). La cellule-fille diploïde peut être homozygote mutante (figure 4, 1), hétérozygote (figure 4, 2) ou homozygote normale (figure 4, 3), et les cellules-filles triploïdes peuvent avoir un allèle mutant chacune (figure 4, 1), une des cellules-filles peut avoir un allèle mutant et l'autre deux allèles mutants (figure 4, 2) et finalement elles peuvent avoir deux allèles mutants chacune (figure 4, 3).

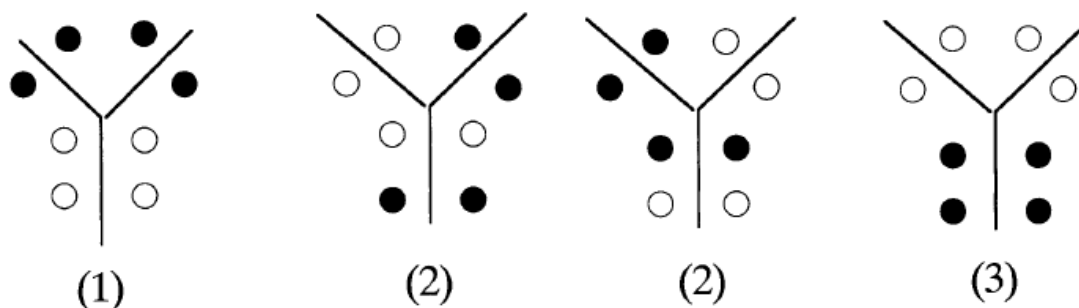


Figure 4. Résultats possibles d'une division tripolaire d'une cellule tétraploïde hétérozygote pour un GST

Trois cellules seront formées suite à une division tripolaire d'une cellule tétraploïde hétérozygote pour un GST : deux cellules triploïdes et une cellule diploïde. La première possibilité (1) est que la cellule diploïde ait deux allèles mutants alors que les cellules triploïdes n'aient qu'un allèle mutant chacune. La seconde possibilité (2) est que la cellule diploïde et qu'une cellule triploïde est un allèle mutant, alors que la seconde cellule triploïde ait deux allèles mutants. Enfin, il est possible que (3) la cellule diploïde ait deux allèles normaux et que les deux cellules triploïdes aient deux allèles mutants chacune.

Adapté de Kaneko et al, 2000.

Ce modèle propose donc que les cellules triploïdes avec deux gènes mutants produisent des tumeurs de pronostic favorable, puisque un GST doit être totalement supprimé (donc nécessiterait ici une mutation sur les trois chromosomes) pour être inactif. L'allèle normal des cellules triploïdes exerce une espèce de protection, produisant une cellule tumorale de faible agressivité. De plus, une telle constitution génétique (comprenant des allèles mutants et normaux) peut prévenir la formation d'anomalies cytogénétiques, soit par une mort cellulaire programmée suite à la détection d'un statut anormal menant à l'élimination de la cellule ou par une absence d'instabilité génomique, ce qui se reflète par le bas pourcentage d'anomalies retrouvées dans les tumeurs triploïdes au FISH (15%). Cette distinction entre les tumeurs triploïdes et diploïdes serait cruciale pour les divergences cliniques importantes retrouvées dans le NB [54, 104].

3.1.2 ANOMALIE DE STRUCTURE : GAIN DE MATÉRIEL GÉNÉTIQUE

Les anomalies structurelles sont beaucoup plus prévalentes dans les tumeurs diploïdes et tétraploïdes que les tumeurs triploïdes [7]. Certaines études avancent que la présence d'anomalies structurelles soit le facteur le plus pronostic de rechute [51].

3.1.2.1 AMPLIFICATION DU GÈNE *MYCN*

Tôt après sa découverte, il a été démontré que l'amplification du gène *MYCN* est corrélée avec la progression tumorale précoce et à l'agressivité du NB [101]. *MYCN* a été le premier exemple d'un marqueur génétique influençant directement le traitement en oncologie pédiatrique. Utilisé de routine en clinique, l'amplification du gène *MYCN* est le facteur pronostique le plus important dans le neuroblastome. Elle se retrouve environ dans 20% des cas et particulièrement dans les tumeurs de stade avancé [10, 50], se retrouvant d'ailleurs plus fréquemment dans les tumeurs diploïdes que triploïdes [66].

Le gène *MYCN*, normalement localisé sur le bras court du chromosome 2 au niveau de la bande p24.1, peut se retrouver un peu partout dans le génome lorsqu'il est amplifié. Après le processus d'amplification, entre 50 et 400 copies du gène se

retrouvent dans chaque cellule [101]. L'amplification peut se manifester sous deux formes cytogénétiques distinctes : soit par du matériel extra-chromosomique sous forme de double-minutes (DM) ou par matériel intra-chromosomique sous forme de « homogeneously staining regions » (HSR) (figure 5). Cependant, l'amplification du gène *MYCN* dans les tumeurs primaires se retrouve presque toujours sous forme de DM, alors que les HSR prédominent dans les lignées cellulaires et la raison de cette dichotomie demeure inconnue [10, 50, 91]. La FISH a permis d'identifier que les HSR sont souvent entourés par des segments du chromosome 17q, suggérant que le chromosome 17 puisse être un site de recombinaison préférentielle pour *MYCN*, possiblement parce qu'ils ont des séquences homologues ou encore parce qu'ils se retrouvent à proximité lors de la réplication de l'ADN [84].

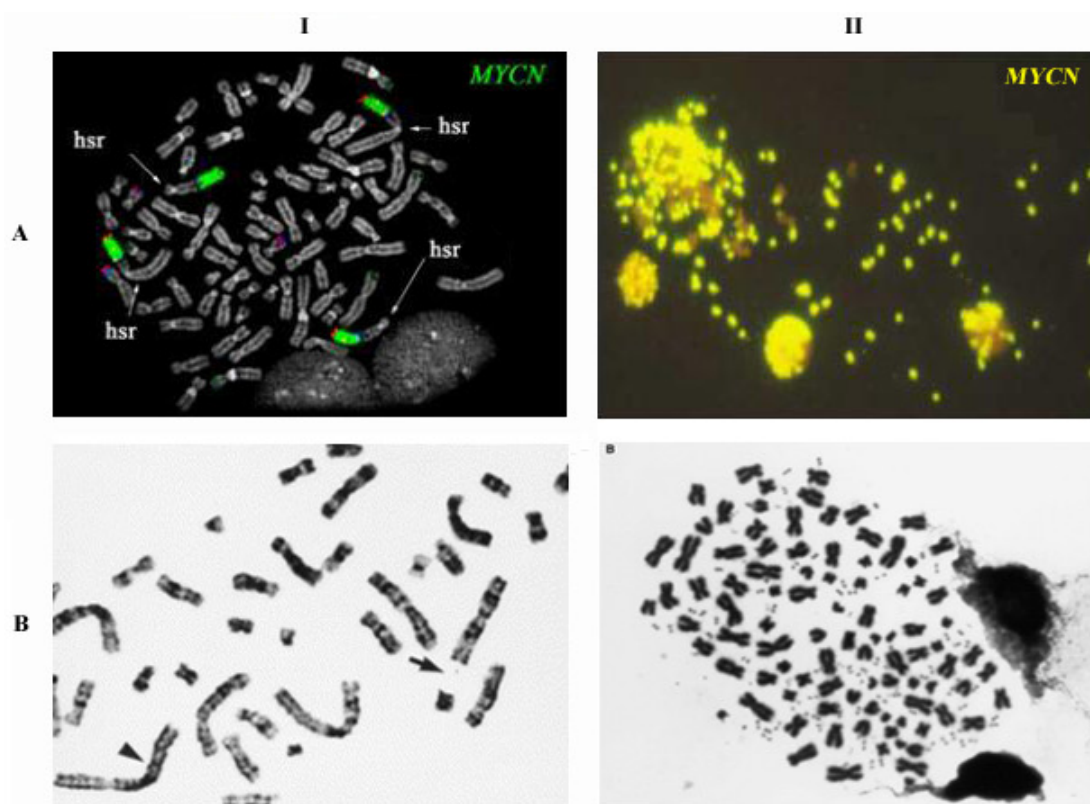


Figure 5. Amplification du gène *MYCN*

L'amplification du gène *MYCN* peut prendre la forme de HSR (indiqué par les flèches en A, I) ou de double minute (II) tel qu'observé en FISH (A) et en cytogénétique standard (B).

Tirées de Storlazzi, 2010 (A, I), Brodeur, 2003 (A, II), Kim, 2001 (B, I) et Murray, 1998 (B, II).

En fait, ce n'est pas uniquement le gène *MYCN* qui est amplifié, mais plutôt une large région du locus 2p24, probablement parce qu'elle confère un avantage sélectif à la cellule. Quoique d'autres gènes soient aussi amplifiés dans la région 2p24, seule l'amplification de *MYCN* a été prouvée comme ayant un effet significatif. En effet, non seulement elle est associée presque exclusivement aux stades avancés de la maladie et à une mauvaise évolution, mais elle est également associée à une progression tumorale rapide et à un mauvais pronostic [40, 50].

MYCN est un proto-oncogène normalement exprimé dans le système nerveux en développement. *MYCN* a une expression très restreinte et est critique dans le développement du SN périphérique et central. Il code une protéine de la famille MYC dont les membres sont des facteurs de transcription régulant la croissance et la prolifération cellulaire. *MYCN* contient deux régions hautement conservées et importantes dans la fonction de la protéine : un signal de localisation nucléaire en C-terminal et une région responsable de la liaison à l'ADN comprenant un domaine hélice-boucle-hélice (HLH) et un domaine leucine à fermeture-éclair. Le domaine HLH est déterminant pour l'interaction protéines-protéines. *MYCN* contient également des « boîtes myc » à sa portion N-terminale dont l'activité est reliée à la transcription. Afin d'agir comme activateur de transcription, *MYCN* doit se dimériser avec la protéine MAX, qui contient également des domaines HLH et leucine à fermeture-éclair, mais dont le domaine HLH est situé en N-terminal. Contrairement à *MYCN*, MAX n'a pas d'activité de transcription et est relativement stable (demi-vie de plus de 12 heures). Le complexe MAX/*MYCN* interagit avec une variété de modificateurs d'histone, ce qui augmente l'acétylation des histones, puis modifie la chromatine au niveau des promoteurs et finalement affecte l'expression du gène. La raison de l'association entre l'amplification de *MYCN* et le phénotype agressif demeure incertaine. Elle peut cependant être en partie expliquée par la surexpression anormale de la protéine *MYCN* qui se lie davantage à MAX et force l'augmentation du complexe MAX/*MYCN*, qui peut perturber l'expression finement régulée de certaines gènes. Ainsi, la liaison entre *MYCN* et MAX entraînerait une activation inappropriée des gènes promoteurs de la croissance cellulaire. Plusieurs cibles de

MYCN sont connues, telles que *MCM7* (initiation de la réplication), *MRP1* (apoptose), *TP53INPI* (influence le p21), *DKKI* (voie wnt/ β -caténine), *NLRRI* (prolifération cellules neuronales), kinase Fyn (différenciation cellulaire) et de multiples gènes modulant l'apoptose et la régulation par p53. L'activation de ces gènes mène à une progression du cycle cellulaire de la phase G0 (quiescence) à la phase G1 (phase d'entrée dans le cycle, début de la croissance cellulaire). Il est donc probable que, malgré la courte demi-vie de MYCN, lorsque la quantité est extrêmement élevée par rapport à la normale, ce qui est le cas dans les cellules tumorales, les cellules demeurent dans la phase G1 et ne retournent pas en phase G0 [45, 67, 74, 122].

Malgré sa grande signification clinique, l'oncogène *MYCN* n'est présent que dans la moitié des neuroblastomes avec un phénotype agressif, ce qui a poussé la recherche d'autres anomalies cytogénétiques spécifiques ou récurrentes [25].

3.1.2.2 GAIN DU CHROMOSOME 17Q

Le gain du 17q est retrouvé dans plus de 50% de tous les neuroblastomes, ce qui en fait l'anomalie génétique la plus fréquemment retrouvée dans ce cancer [8]. Toutefois, le type d'anomalie diffère. En effet, un gain du chromosome entier (anomalie de nombre) est principalement retrouvé dans les tumeurs de bas grade alors qu'un gain d'une partie du chromosome 17q (anomalie de structure) est retrouvé dans les tumeurs de haut grade [7]. Les points de cassure du bras long du chromosome 17 varient, mais la plus petite région commune de gain identifiée se situe autour de la région chromosomique 17q23.1→qter [79]. Certaines études décrivent une association significative entre le gain 17q et la diploïdie ou la tétraploïdie de la tumeur [6, 10, 25, 49] ainsi qu'avec d'autres facteurs de mauvais pronostic tels les patients plus âgés, l'amplification du gène *MYCN* et la délétion 1p [8]. La fréquence de l'anomalie du 17q a attiré beaucoup d'attention sur cette anomalie, mais il a été impossible de déterminer avec certitude que des gènes sur le 17q étaient responsables d'un phénotype plus agressifs [115].

Un gain partiel du 17q est souvent retrouvé dans les tumeurs primaires avec d'autres anomalies structurales. Le mécanisme principal de ce gain partiel est la translocation déséquilibrée dont le partenaire le plus fréquent est le chromosome 1, résultant en une délétion 1p36 et un gain 17q. Il a cependant été démontré que les points de cassure sur le chromosome 17q sont hétérogènes [60] et que ces translocations déséquilibrées peuvent survenir avec d'autres partenaires [94, 116]. De façon intéressante, les études cytogénétiques ont démontré que la plupart des anomalies structurales retrouvées dans le neuroblastome sont dues à une translocation déséquilibrée. D'ailleurs, la plupart des tumeurs avec gain du 17q montrent plusieurs autres anomalies de structure, telles les délétions 11q et 1p et l'amplification du gène *MYCN*, alors que les tumeurs sans gain 17q ont peu ou pas d'autres anomalies structurales [116]. Il est possible que la translocation déséquilibrée survienne suite à un point de contrôle intra-S défectueux ou suite à une recombinaison mitotique non homologue durant la transition S/G2 du cycle cellulaire, ce qui serait facilité par la proximité des chromatides 1 et 17 lors de la réplication de l'ADN. Puisque le gain préférentiel du 17q semble indiquer un effet de dosage génique donnant un avantage sélectif à la cellule (la progression tumorale), le gain d'oncogène semble plus probable que l'interruption d'un GST. Même si quelques gènes ont été mentionnés dans la littérature, tels *NME1* (possiblement suppresseur de métastases) et *ERBB2* (oncogène, récepteur tyrosine kinase), aucun ne fait l'objet d'un consensus [6, 10, 21, 50, 51, 58, 60].

3.1.3 ANOMALIE DE STRUCTURE : PERTE DE MATÉRIEL GÉNÉTIQUE

3.1.3.1 DÉLÉTION DU CHROMOSOME 1P

La délétion du bras court du chromosome 1 est une anomalie commune survenant dans 30-35% des neuroblastomes et est retrouvée plus communément chez les patients avec un stade avancé de la maladie. Les études ont révélé plusieurs sites de délétion sur la portion distale du 1p variant pour la plupart de 1p22 à 1pter, mais la région minimale commune de délétion se situe autour du 1p36.2 [38, 77, 108, 124].

Les délétions retrouvées sur le 1p sont larges, comprenant souvent une bonne partie du bras chromosomique. Les largeurs des délétions 1p montrent toutefois une variation entre les études, puisqu'elles peuvent être des délétions terminales autant que des réarrangements provenant de translocations déséquilibrées. Néanmoins, toutes ces régions sont étudiées intensivement afin d'identifier les GST qui pourraient s'y trouver. Plusieurs candidats sont ressortis de la littérature, notamment *CHD5*, *TNFRSF25* et *CAMTA1*[85]. Il est intéressant de noter que les délétions 1p ne sont pas spécifiques au neuroblastome [7, 10], mais sont étudiées dans d'autres tumeurs malignes; autant dans les tumeurs solides (notamment dans le gliome [5], l'oligoastrocytome [68] et le cancer du colon [35]), qu'hématopoïétiques [52].

Les premières études ont démontré que la délétion 1p était de mauvais pronostic [24, 46]. Toutefois, la valeur pronostique de la délétion 1p36 est controversée. En outre, d'autres études plus récentes précisent que la délétion 1p36 est prédictive d'une évolution de la maladie, mais pas de la survie globale des patients [20, 76]. Plusieurs études ont démontré la corrélation entre la délétion 1p et d'autres facteurs indiquant un mauvais pronostic (délétion 11q, amplification du gène *MYCN*, âge) [20, 36, 76]. En effet, la délétion 1p et l'amplification du gène *MYCN* sont fortement corrélées avec une mauvaise évolution, mais également entre elles, ce qui met un doute sur l'indépendance des deux facteurs pronostiques [4, 7, 10]. D'ailleurs, certaines études ont démontré que l'impact négatif de la délétion 1p est uniquement présent lors de l'amplification du gène *MYCN* [38] ou, du moins, que la délétion 1p ne l'emporte pas sur les autres facteurs de mauvais pronostics (âge, *MYCN*), ce qui ne lui confère pas de valeur pronostic indépendante dans les tumeurs de haut grade [76].

La plupart des tumeurs avec amplification du gène *MYCN* ont aussi une délétion 1p, mais l'inverse est moins fréquent, indiquant que la délétion 1p pourrait précéder le développement de l'amplification. L'explication de ce phénomène peut être qu'il est nécessaire de supprimer un gène régulant l'expression de *MYCN* ou un gène déclenchant l'apoptose lors d'une surexpression de *MYCN* pour voir l'amplification. Une autre possibilité pour expliquer ce lien est qu'une anomalie génétique sous-

jacente cause une instabilité génomique prédisposant à la délétion 1p et ensuite à l'amplification du gène *MYCN* [10].

3.1.3.2 DÉLÉTION DU CHROMOSOME 11Q

La délétion 11q est retrouvée chez 43% des patients, ce qui en fait la délétion la plus fréquente dans le neuroblastome. La région minimale délétée identifiée se retrouve en 11q21-q23 [44, 71, 115], ce qui suggère la présence d'un gène suppresseur de tumeur à cette localisation [74], mais aucun gène n'a été identifié à ce jour. D'ailleurs, la majorité des délétions 11q sont larges et terminales plutôt qu'interstitielles [44] et surviennent dans les tumeurs n'ayant pas d'amplification du gène *MYCN* [4]. En effet, contrairement à la délétion 1p, la délétion 11q est inversement corrélée avec l'amplification du gène *MYCN* [44]. Elle serait également associée avec la délétion 14q et inversement corrélée avec la délétion 1p. La perte d'hétérozygotie (LOH) 11q est associée avec une diminution de la survie sans événement (EFS), mais seulement chez les patients qui n'ont pas d'amplification du gène *MYCN*, ce qui est probablement dû au fait que peu de tumeurs ont ces deux anomalies simultanément, mais si cette situation survient, la valeur pronostique de *MYCN* est dominante. Néanmoins, la perte du 11q pourrait être un marqueur pour identifier les NB de pronostic défavorable lorsque l'amplification du gène *MYCN* est absente [4, 10, 25, 44].

Basé sur le potentiel pronostique de la délétion 11q, Fisher et al (2010) ont subdivisé les neuroblastomes n'ayant pas d'amplification de *MYCN* ni de délétion 1p en quatre groupes selon leur statut 11q : anomalies du 11q avec évolution favorable, anomalies du 11q avec évolution défavorable, 11q normal avec évolution favorable et 11q normal avec évolution défavorable. Ce faisant, ils ont remarqué des différences d'expression d'ARN entre les tumeurs à évolution favorable et défavorable. Par ailleurs, l'expression diminuée des gènes du 11q apparaissait seulement dans le groupe avec anomalies du 11q à évolution défavorable. Ces résultats renforcent donc l'hypothèse que la délétion 11q permet la distinction de deux sous-groupes (avec et sans anomalies du 11q) qui diffèrent dans leur phénotype et leur génotype.

3.1.3.3 AUTRES (3p, ...)

Plusieurs autres délétions ou pertes alléliques ont été retrouvées à différents sites par des techniques telles les analyses de biologie moléculaire, la CGH ou le SKY, mais leurs significations biologique ou clinique ne sont pas élucidées. La délétion 3p est une découverte relativement récente dans le NB. Elle a été identifiée dans les tumeurs de stades 4 et 4s par quelques études, suggérant qu'elle puisse influencer l'acquisition du potentiel métastatique. Cependant, d'autres études l'ont retrouvée dans les tumeurs de bas grade. Elle serait présente dans 15-20% des tumeurs, mais la fréquence de cette anomalie semble très variable [25, 50, 116].

Des anomalies ont également été retrouvées sur d'autres chromosomes, dont le 4p, le 5q et le 19p, mais pas d'évidence de corrélation entre ces anomalies et les critères biologiques ou cliniques n'a été trouvée [6, 10, 109].

3.1.4 PERTE D'HÉTÉROZYGOTIE

Représentant une étape clé dans l'inactivation de plusieurs GST, la perte d'hétérozygotie (LOH) est, littéralement, la conversion somatique d'un allèle germinale hétérozygote en un état homozygote (présence de deux allèles identiques) ou hémizygotique (présence d'un seul allèle). Ces états peuvent être acquis par délétion, donc perte d'une copie de l'ADN, ou par perte d'un allèle tout en ayant deux copies d'ADN (ou en étant « copie neutre »), ce qui distingue deux formes de LOH [29, 83]. La LOH à copie neutre (CN-LOH) peut survenir suite à plusieurs mécanismes, tels l'isodisomie, une délétion suivie d'une recombinaison utilisant le chromosome homologue (figure 6) ou encore une faiblesse dans la machinerie de réparation de l'ADN, de la machinerie du fuseau mitotique (figure 6) ou du rapetissement des télomères. La recombinaison mitotique est d'ailleurs considérée comme un contribuant majeur des CN-LOH acquis. Les CN-LOH sont fréquemment retrouvées dans plusieurs cancers, dont les cancers hématologiques [83].

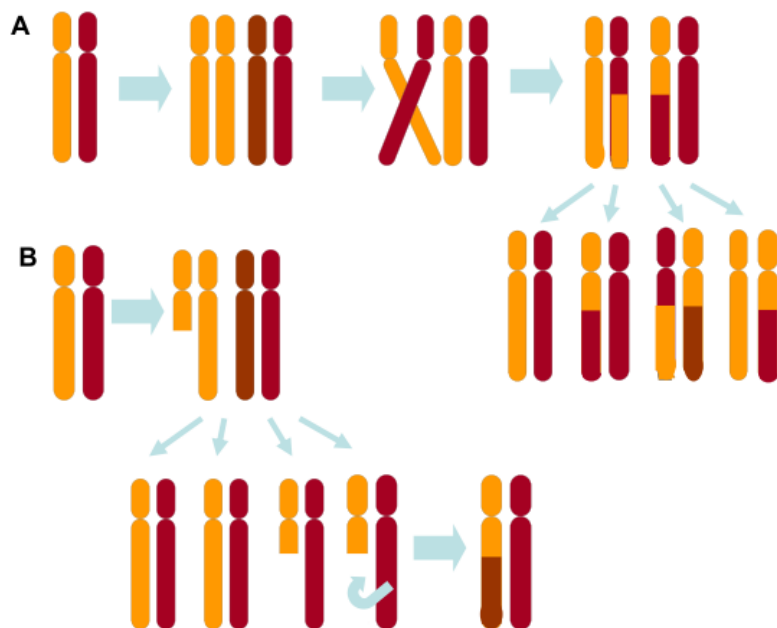


Figure 6. Mécanismes mitotiques pour la formation de CN-LOH

Les CN-LOH peuvent survenir suite à une recombinaison mitotique entre des chromosomes homologues, dépendamment de la façon dont les chromosomes sont positionnés pendant la mitose (A). Elles peuvent aussi survenir comme conséquence d'une délétion suivie par une recombinaison en utilisant le chromosome homologue comme modèle pour la correction (B).

Tiré de O'Keefe, 2010.

Il existe une certaine confusion dans la littérature concernant l'utilisation de l'acronyme LOH; certains l'utilisent comme synonyme de délétion (une définition erronée), d'autres dans son sens global comprenant les délétions et les CN-LOH, et finalement désignant seulement les CN-LOH. Cette confusion provient notamment du fait que dépendamment de la technique choisie pour la détection des LOH (RFLP, SNP, ...), il n'est pas toujours possible d'en distinguer le type (délétion ou CN-LOH). Ainsi, il est souvent difficile de comparer adéquatement les études portant sur les pertes d'hétérozygotie. Dans ce mémoire, l'acronyme LOH sera utilisé dans son sens global (délétions et CN-LOH).

LOH DU CHROMOSOME 14Q

Quoique moins citée dans la littérature, une LOH du bras long du chromosome 14 a été retrouvée en plus grande fréquence dans le neuroblastome [36, 48, 105, 106, 111]. Cette perte allélique se retrouverait dans 23 à 30% des tumeurs. Une région

consensus semble apparaître dans la littérature en 14q23 – q32 [48, 111]. Plus précisément, la région de délétion interstitielle a été proposée entre les loci D14S1 et D14S16, localisé dans la bande 14q32 [107, 110]. Il est intéressant de noter que le gène *MAX* dont la protéine interagit avec *MYCN* afin de lui prodiguer sa fonction (voir section 3.1.2.1) est localisé en 14q23 [74], à la bande proximale de la région consensus. Il est intéressant de noter que la LOH du 14q n'est pas exclusive au neuroblastome. Elle a en effet déjà été retrouvée dans certains cancers rénaux [23, 112], dans le myélome [120] et dans les carcinomes à cellules squameuses (tête et cou) [90].

Il a d'autre part été rapporté que la moitié des délétions du 14q dans le neuroblastome survenaient dans des tumeurs tétraploïdes, ce qui pourrait indiquer que ces réarrangements seraient des anomalies secondaires [6, 10, 116]. Seules quelques études décrivent des délétions cytogénétiquement visibles en 14q [12, 92]. Ces délétions sont souvent trop petites pour être identifiées facilement par la cytogénétique classique [74]. La LOH 14q serait fortement corrélée avec la délétion 11q et aurait une corrélation inverse avec la délétion 1p et l'amplification du gène *MYCN* [36, 111].

De plus, la LOH 14q ne surviendrait pas simultanément avec l'amplification du gène *MYCN*, sauf si une anomalie du 1p est également présente [36]. Ainsi, la présence de la délétion 14q pourrait être utilisée pour identifier un sous-groupe génétique de NB ne contenant pas l'amplification *MYCN*, tel que la division proposée par Fong et al (1992) : (a) tumeur sans LOH et sans amplification du gène *MYCN*, (b) tumeur avec LOH 1p et amplification du gène *MYCN* (peu importe le statut de 14q) et (c) tumeur avec LOH 14q sans amplification du gène *MYCN* [36]. Le premier groupe étant associé aux tumeurs de bas grade, alors que les 2 autres se retrouvaient dans les tumeurs de haut grade. Toutefois, aucune autre corrélation n'a été trouvée avec des facteurs biologiques ou cliniques, tels l'âge au diagnostic ou la ploïdie, ni avec l'évolution de la maladie. La signification de la LOH 14q reste donc à déterminer [36, 48]. La LOH 14q n'est pas exclusive au neuroblastome, elle a notamment été

retrouvée dans les tumeurs stromales gastrointestinales multiples dans la neurofibromatose de type I [127] et elle a été associée à un mauvais pronostic dans les carcinomes à cellules squameuses du cou [90] et dans les méningiomes extracrâniens [43].

Le bras long du chromosome 14 est notamment intéressant par le fait que le gène *AKT1* y est situé. AKT, une sérine-thréonine kinase, est un pivot pour les voies de signalisation de presque tous les récepteurs tyrosine-kinase (RTK). Elle fait partie de la voie PI3K, qui semble être une des voies de signalisation pro-survie les plus puissantes. En effet, elle régule les cascades de signalisation de plusieurs mécanismes cellulaires. Il est d'ailleurs spéculé que cette voie est une des plus cruciales pour le développement et le maintien du cancer [86, 125]. Elle est d'ailleurs communément retrouvée dérégulée dans plusieurs cancers, dont le glioblastome et les cancers du sein, de la prostate et des poumons [117].

Un des médiateurs critiques de la voie PI3K est AKT, qui est connu pour augmenter la prolifération cellulaire, la synthèse protéique, influencer le cycle cellulaire et inhiber l'apoptose et ce, en régulant l'activité de plusieurs cibles dont des kinases et des facteurs de transcription (figure 7). AKT est activé par un mécanisme de régulation qui requiert d'une part la translocation à la membrane plasmique et la phosphorylation de deux acides aminés (la thréonine 308 et la sérine 473). L'activation inappropriée de la voie PI3K/AKT dans le cancer peut être causée par une anomalie génétique (ex : mutation) ou par la sur-stimulation d'un récepteur tyrosine kinase par un facteur de croissance (ex : EGF) [86, 87, 97].

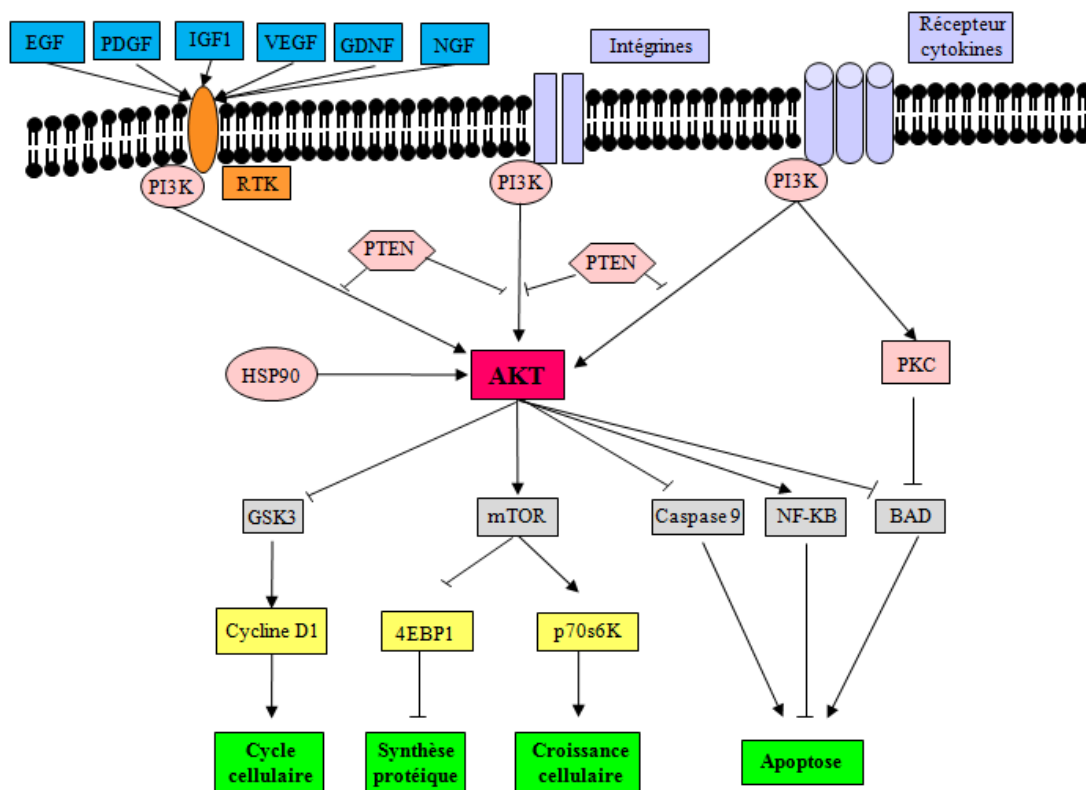


Figure 7. Voie de signalisation PI3K/AKT et son implication dans les processus cellulaires

Divers facteurs de croissance, des intégrines ou des cytokines peuvent activer PI3K, qui active à son tour AKT. L'action d'AKT est à la fois inhibitrice (GSK3, Caspase 9, BAD) et activatrice (mTOR, NF-κB), régulant ainsi plusieurs processus cellulaires. Adapté de Sartelet, 2008.

Il a été démontré que la phosphorylation d'AKT est un événement fréquent dans le neuroblastome et que l'activation d'AKT est un facteur de mauvais pronostic dans le NB, réduisant la survie sans événement (EFS) et la survie globale (OS) [86]. De plus, l'activation d'AKT est corrélée avec des facteurs de mauvais pronostic tels que l'amplification *MYCN*, la délétion 1p36, le stade INSS avancé, l'âge au diagnostic et l'histologie non favorable. Toutes ces évidences portent à penser que l'activation d'AKT pourrait être un nouveau facteur pronostic dans le neuroblastome [86]. D'un point de vue du traitement d'une tumeur comme le neuroblastome, cibler AKT serait très avantageux puisque cette stratégie devrait être efficace pour bloquer les voies de signalisation critiques pour la survie. Il a d'ailleurs été démontré que la chimiothérapie était plus efficace lorsqu'elle était co-administrée avec un inhibiteur des RTK [11, 34, 37]. Quelques inhibiteurs spécifiques d'ATK ont été développés,

mais ils ont pour l'instant affichés une trop grande toxicité systémique lors des études cliniques. Tout récemment, un nouvel inhibiteur de la signalisation d'AKT, la perifosine, semble changer la situation, puisqu'il semble efficace pour le traitement du neuroblastome sans toutefois afficher une aussi grande toxicité [11, 63].

3.2 ÉTAT DE LA RECHERCHE

Certaines de ces anomalies génétiques sont des facteurs actuellement utilisés pour le pronostic du neuroblastome alors que d'autres ont été laissées de côté ou sont encore sous investigation. Toutefois, des recherches récentes pointent plutôt vers une analyse globale du génome plutôt que l'analyse des marqueurs individuels pour pouvoir stratifier correctement les tumeurs [51].

3.2.1 DIVISION DES NEUROBLASTOMES EN DEUX PROFILS DISTINCTS

La recherche sur la génétique du neuroblastome a permis d'indiquer qu'il existe au moins deux grands profils génétiques distincts qui sont hautement prédictifs du comportement clinique. Le premier est hyperdiploïde ou triploïde. Il ne contient pas ou peu d'anomalies de structure et n'a pas d'amplification du gène *MYCN*. Généralement, il exprime un haut niveau de TrkA et ces cellules sont enclines à se différencier ou devenir apoptotiques, selon la présence du ligand de TrkA (NGF). Ce sont des neuroblastomes localisés chez des enfants âgés de moins de 18 mois qui ont un bon pronostic. Le second est diploïde et comprend souvent des remaniements chromosomiques. Ce deuxième profil est au contraire associé à un mauvais pronostic. Il est possible d'en distinguer deux sous-types. Le premier est caractérisé par d'autres anomalies structurelles (en plus du 17q), telles des délétions 11q et/ou 14q, mais n'ont pas d'amplification du gène *MYCN* et n'ont généralement pas de délétion 1p. Les patients ayant ce sous-type de tumeur sont plus âgés, avec des NB de plus haut grade progressant lentement. Le second sous-type, dans lequel on retrouve l'amplification du gène *MYCN* et habituellement la délétion 1p, progresse rapidement et est plus agressif. Peu importe le sous-type, ces tumeurs expriment souvent TrkB et son ligand BDNF, qui forment une boucle de régulation autocrine conférant un

avantage sélectif aux cellules cancéreuses. Les patients atteints de ce profil de NB sont généralement âgés de 18 mois et plus, avec des tumeurs de haut grade qui sont très souvent fatales [10, 91, 104]. Malheureusement, des échecs de traitement surviennent encore dans tous les sous-groupes de neuroblastomes, ce qui suggère que des marqueurs pronostiques additionnels qui raffineraient la classification des tumeurs permettraient une meilleure prise en charge des patients.

3.2.2 PRÉCISER LA CLASSIFICATION

Afin de préciser la classification du NB, un modèle de segmentation des NB en cinq types distincts a été proposé [51]. Il se base sur les anomalies génétiques du NB, qu'elles soient de nombre et/ou de structure, mais selon une analyse globale du génome plutôt que de considérer uniquement les anomalies fréquemment retrouvées dans le NB. Les trois premiers types (A, B et C) contiennent des anomalies de nombre ou de structure (tumeurs non mixtes), alors que les deux autres types (D et E) contiennent à la fois des anomalies de nombre et de structure (tumeurs mixtes). Le type A serait de bon pronostic, alors que les types B et C auraient un moins bon pronostic. Selon cette étude, les anomalies de structure seraient plus prédictives que les anomalies de nombre, conférant un mauvais pronostic aux tumeurs mixtes.

Type A: Anomalies de nombre seulement.

Type B: Anomalies de structure sans amplification de *MYCN*, ni anomalie de nombre.

Type C: Anomalies de structure avec amplification de *MYCN*,
sans anomalie de nombre.

Type D: Tumeurs mixtes sans amplification de *MYCN*.

Type E: Tumeurs mixtes avec amplification de *MYCN*.

Une autre segmentation [61, 114] propose de diviser le groupe de neuroblastomes de haut risque en deux sous-types génétiques majeurs. Le premier comprend les tumeurs avec amplification de *MYCN* et délétion 1p. Le second quant à lui n'a pas d'amplification de *MYCN* ni délétion 1p, mais a une LOH 11q directement associée avec une délétion 14q.

3.2.3 PRÉVOIR LA PROGRESSION : UN MODÈLE GÉNÉTIQUE

Afin d'expliquer les différences génotypiques et phénotypiques dans le neuroblastome, un modèle théorique pour le développement et l'évolution du NB a été développé (figure 8) à partir du regroupement de tumeurs selon la segmentation expliquée dans la section précédente. Dans ce modèle, la plupart des NB surviennent *de novo*, suite à une modification du progéniteur glial-neuronal. Ce progéniteur peut demeurer indifférencié et donner un NB de mauvais pronostic (types B ou C, selon le statut de *MYCN*), ou peut avoir débuté sa différenciation ou encore être devenu mature et former un neuroblastome de bon pronostic avec uniquement des anomalies de nombre (type A).

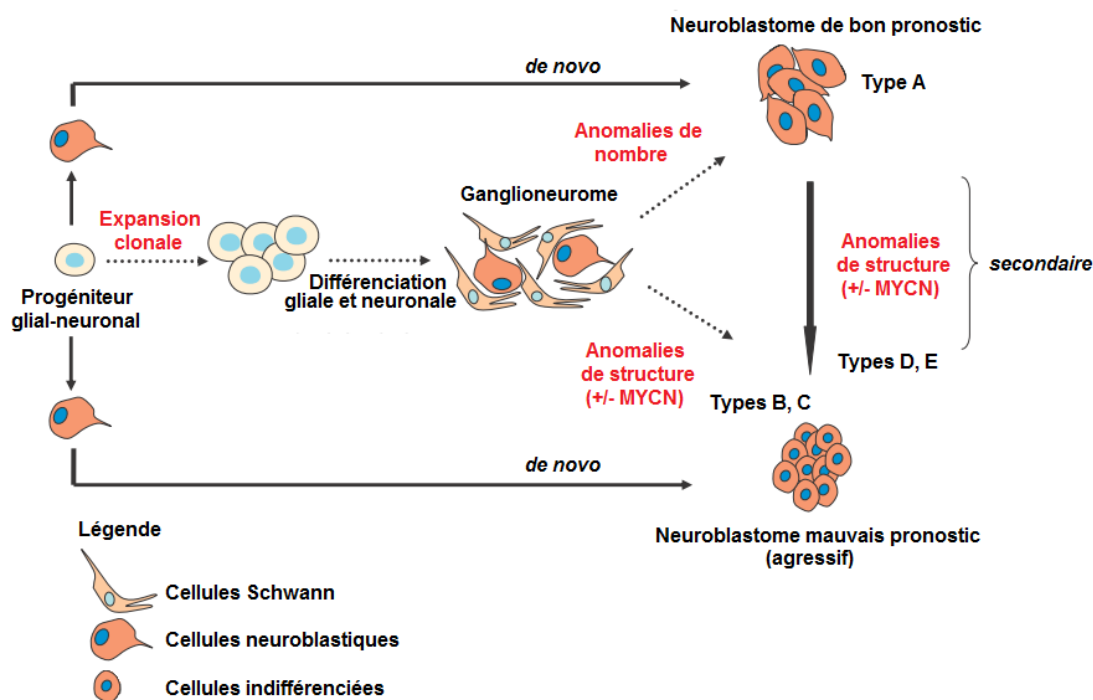


Figure 8. Modèle hypothétique de la progression du neuroblastome.

Autant les NB de bon pronostic que de mauvais pronostic proviennent d'un progéniteur glial-neuronal, que ce soit *de novo* ou suite à une expansion clonale, à laquelle s'ajoutent des anomalies de nombre pour les NB de bon pronostic ou des anomalies de structure pour les NB de mauvais pronostic. Les NB de bon pronostic pourrait également évoluer, notamment par le gain d'anomalies de structure, en neuroblastome de mauvais pronostic.

Adapté de Janoueix et al, 2010.

Cependant, plusieurs études ont soulevé la possibilité qu'une tumeur de bas grade puisse évoluer vers un plus haut grade. Les observations ayant mené à cette hypothèse font état d'une part de l'âge du diagnostic plus élevé dans les tumeurs mixtes et d'autre part que certains ganglioneuromes polyclonaux possèdent des nodules neuroblastiques avec un stroma sans anomalies, alors que d'autres ganglioneuromes comprennent des cellules tumorales et stromales avec les mêmes anomalies, donc sont monoclonaux. Ainsi, la possibilité de progression a été ajoutée au modèle : les progéniteurs pourraient subir une expansion clonale, puis se différencier pour former un ganglioneurome sans anomalies. Dans un deuxième temps, les cellules neuronales du GN acquerraient des anomalies de nombre pour former un NB de bon pronostic (type A) ou de structure, notamment par des translocations déséquilibrées, pour former un NB de mauvais pronostic (types B, C). Compte tenu de l'hypothèse de progression, le modèle inclut également la possibilité que les neuroblastomes de bas grade *de novo* puissent par la suite acquérir des anomalies structurelles afin de former un NB de haut grade (types D ou E, selon le statut de *MYCN*). Ainsi, les neuroblastomes de mauvais pronostic pourraient également survenir de façon secondaire [50, 51, 91]. Quoique la progression soit théoriquement possible, aucun cas de neuroblastomes de bas grade évoluant en neuroblastome de haut grade chez un même patient n'a été décrit dans la littérature [126].

3.2.1 L'APPORT DES TECHNIQUES DE POINTE

Ces nouvelles propositions concernant la sous-division des tumeurs et la progression du neuroblastome sont rendues possibles grâce aux techniques de pointe permettant une analyse plus précise et plus complète des anomalies génétiques de la tumeur. Ainsi, ces études récentes utilisent notamment l'hybridation génomique comparative sur micropuces d'ADN et/ou le polymorphisme de nucléotide simple pour raffiner la recherche et faire avancer les connaissances scientifiques sur ce cancer pédiatrique qui demeure un véritable défi pour les scientifiques et les cliniciens.

4 TECHNIQUES UTILISÉES POUR LA DÉTECTION DES ANOMALIES GÉNÉTIQUES

Depuis la mise au point de techniques permettant d'analyser le génome, il a rapidement été démontré que le cancer est composé d'un ensemble d'anomalies génétiques. Cette découverte a mené à un effort pour décrire les anomalies génétiques dans les différents cancers, y compris le neuroblastome, afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer une classification adéquate. Plusieurs avancements technologiques remarquables sont apparus avec les années (biologie moléculaire, chimie, imagerie, ...), ce qui a permis et permet toujours l'identification de nouvelles anomalies et entraîne une meilleure compréhension du cancer.

4.1 CYTOGÉNÉTIQUE STANDARD

La variation de la structure des chromosomes est connue depuis l'arrivée des bandes chromosomiques. L'examen des caryotypes standards a non seulement fourni de l'information sur les causes de syndromes génétiques, mais a également révélé des différences structurelles microscopiques détectables dans la population générale [32]. La cytogénétique conventionnelle permet de visualiser les segments d'aneusomie pour des régions chromosomiques allant de 2 à 10 Mb (pour des images de cytogénétique standard, voir figure 5, BI et BII). Les études en cytogénétique classique des neuroblastomes primaires permettent de révéler des anomalies chromosomiques dans seulement 20-30% des cas [59].

4.2 HYBRIDATION *IN SITU* EN FLUORESCENCE

L'introduction de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) a causé une explosion d'information sur la prévalence et la variété des réarrangements chromosomiques, car elle a permis une analyse plus fine des chromosomes par rapport à la cytogénétique standard. Cette technique est actuellement couramment utilisée pour le diagnostic clinique [32]. Les techniques d'hybridation *in situ* reposent sur la capacité des fragments d'ADN (les sondes) marqués par un fluorochrome de s'hybrider avec un ADN complémentaire (l'échantillon). Une sonde dénaturée en solution peut s'hybrider spécifiquement avec sa séquence cible (préparation sur lame) grâce à la

complémentarité des bases nucléotidiques. Les hybrides non spécifiques et les molécules de sonde non hybridées sont éliminés par lavage. Les hybrides spécifiques sont révélés par la fluorescence. Un microscope à fluorescence équipé de filtres appropriés aux fluorochromes permet l'analyse des séquences hybridées [59] (pour des images de la FISH, voir figure 5, AI et AII). La FISH peut être appliquée sur des chromosomes en métaphase ou sur des noyaux en interphase.

La capacité de localiser des segments spécifiques d'ADN a permis d'identifier des gains, des pertes et des réarrangements de séquences ADN visibles ou non en cytogénétique classique. La sensibilité de la FISH est limitée par la taille des sondes utilisées et par le fait que seule la région génomique reconnue par cette sonde peut être visualisée [59].

4.3 CYTOMÉTRIE DE FLUX

La cytométrie de flux est une technique permettant d'analyser un grand nombre de cellules rapidement et peut être utilisée en oncologie pour déterminer la quantité cellulaire d'ADN (la ploïdie). Cette technique utilise un fluorochrome (généralement l'iodure de propidium, un agent intercalant des acides nucléiques) pour marquer l'ADN. Une fois marquées, les cellules sont passées une à une à travers une source lumineuse (habituellement un laser) reconnaissant la lumière émise par le fluorochrome. L'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN présente. Les signaux détectés sont transmis à un ordinateur qui transforme les signaux lumineux détectés en un histogramme dont l'axe des abscisses affiche l'intensité de la fluorescence et l'axe des ordonnées affiche le nombre de cellules, permettant l'interprétation de la ploïdie [78].

4.4 HYBRIDATION GÉNOMIQUE COMPARATIVE

Plus récemment, l'emphase a été placée sur la caractérisation des variations du génome, qui varie d'un seul nucléotide à des changements chromosomiques visibles, en passant par des variations structurelles submicroscopiques (moins de 5Mb) [32]. Ces variations sont des gains ou des délétions de taille variable (d'un kb à plusieurs

mb). La découverte que des gains et des délétions de plus d'un kilobase contribuent de façon significative à la variation du génome humain a attiré l'attention sur le rôle des gains et des pertes dans l'étiologie des maladies avec une composante génétique telle que le cancer [32].

L'hybridation génomique comparative (CGH) est une technique qui a d'abord été décrite pour les gains et les pertes dans les tumeurs solides. La première technique CGH évaluait ses anomalies par une hybridation comparative en métaphase d'un ADN d'intérêt (par exemple d'une tumeur) et d'un ADN de référence (d'un individu normal). Le ratio de l'ADN d'intérêt sur l'ADN de référence était utilisé pour déterminer les séquences relatives des gains et des pertes dans le génome d'intérêt comparé à la référence. Cette technique est utile pour les déséquilibres de grande taille, mais l'utilisation de chromosome en métaphase rendait la détection des anomalies plus petites que 20 Mb difficile. Une technologie plus récente est le CGH-sur micropuces qui est utilisé pour tester le dosage (gain, délétion) des régions chromosomiques d'intérêt, permettant d'identifier des anomalies plus petites. La résolution du CGH-array dépend de la densité et de la taille des sondes (le plus souvent des sondes de 80-200kb) [32].

En une seule technique, la CGH permet d'identifier des anomalies génomiques habituellement identifiées par l'analyse en cytogénétique standard et de multiples techniques de FISH. Un des désavantages du CGH est que les réarrangements équilibrés tels que les translocations ou les inversions ne peuvent pas être détectés par cette méthode [32].

Des études ont indiqué que l'hybridation génomique comparative (CGH) est un outil utile pour détecter non seulement la présence de délétion (tel 1p), mais également l'étendue de la perte chromosomique dans la même région. Il peut également détecter la présence d'amplification (tel que *MYCN*). La technique CGH a donc la capacité de détecter les anomalies génétiques connues et importantes cliniquement du neuroblastome [59].

4.5 POLYMORPHISME NUCLÉOTIDIQUE SIMPLE

Avec l'achèvement du « Projet Génome Humain », un grand nombre de variations subtiles (polymorphismes) a été retrouvé dans la population. Le type le plus abondant de ces variations est le polymorphisme nucléotidique simple (SNP), causé par l'accumulation de mutations ponctuelles pendant l'évolution. Un SNP est une variation d'un seul nucléotide à une localisation spécifique du génome dont, par définition, la fréquence de l'allèle mineur est supérieure à 1% dans la population. Autrement, la variation est considérée comme un variant ou une mutation. La fréquence moyenne des SNPs dans le génome humain est d'environ 1 par 1000 paires de base, pour un total estimé à 10 millions dans tout le génome. Actuellement, environ 5,6 millions de SNP ont été décrits. Les SNPs ne sont pas distribués uniformément à travers le génome; ils se retrouvent plus fréquemment dans les régions non codantes. Toutefois, quand les SNPs sont présents dans des régions codantes comme des sites de régulation des gènes, ils peuvent affecter le taux de transcription causant des changements dans la production de la protéine encodée. Dans les études génétiques sur les maladies qui utilisent les SNPs, le but est d'identifier des SNPs qui causent un changement dans la biologie cellulaire induisant ainsi un état morbide [29, 56].

Dans le but d'étudier la susceptibilité génétique germinale à des maladies complexes, des puces ont été développées pour évaluer ces SNPs. La technique SNP se base sur la comparaison de l'ADN d'intérêt à une matrice contenant des puces d'ADN parfaitement complémentaire (match) et de l'ADN présentant des variations dans sa séquence et n'étant donc pas parfaitement complémentaire (mismatch). Après l'hybridation, la fluorescence émise est mesurée pour chaque allèle de chaque SNP (pour plus de détails sur la technique, voir la section Matériel et méthodes). L'utilisation de ces puces pour analyser les altérations somatiques dans le cancer a été proposée suite à trois caractéristiques de la technique SNP : la capacité d'analyser les LOH, la possibilité de déterminer les variations du nombre de copies de l'ADN à

partir de l'intensité des signaux reflétant le niveau d'hybridation et l'analyse de haute résolution permise par la densité des SNPs [29].

Les SNPs permettent donc de rechercher des déséquilibres alléliques à un haut débit et ce, à travers le génome entier. En effet, l'analyse des SNPs permet la détection d'anomalies génotypiques dans les tumeurs de patients et, en principe, l'identification de nouvelles aires de déséquilibre allélique qui pourraient contenir des GST potentiels. De plus, cette méthode permet de mesurer simultanément le nombre de copies d'ADN en utilisant des algorithmes qui comparent l'intensité des puces parfaitement complémentaires à un ratio d'intensité entre les puces parfaitement complémentaires et celles ayant une moins bonne complémentarité. Un autre avantage majeur du SNP est la densité de marqueurs permettant d'identifier des régions de LOH. Pour ce faire, les analyses statistiques du logiciel sont appliquées à différentes régions homologues consécutives de SNP qui sont plus longues que prévues par le hasard uniquement. En outre, parce que les LOH peuvent survenir sans changement du nombre de copies d'ADN, les puces SNPs offrent un plus grand potentiel que la CGH pour détecter de tels événements. Les puces SNPs ont plusieurs avantages sur les méthodes plus conventionnelles d'analyse du génome dans le cancer en termes d'efficacité, de précision et de nécessité minimale d'ADN [29, 40].

La haute densité de SNP permettant une analyse globale du génome, ces puces ont été utilisées pour identifier des allèles mettant à risque de maladies, telle la dégénérescence maculaire et la leucémie lymphoïde chronique. Ces résultats sont particulièrement intéressants puisqu'ils ont permis l'identification de gènes pouvant être impliqués dans le développement de ces maladies [29].

L'utilisation de la technique SNP dans le neuroblastome a débuté au milieu des années 2000 pour l'analyse de tumeurs et de lignées cellulaires. Dans les deux cas, cette technique a permis de découvrir de nouvelles régions d'anomalies chromosomiques non visibles par CGH ou par la cytogénétique standard, fournissant donc des informations complémentaires à ces techniques [17, 22, 39]. L'analyse du

génomique entier, la précision et la puissance des SNPs ont également permis d'identifier de possibles facteurs pronostics dans le neuroblastome.

Les premières études en SNP sur le neuroblastome ont notamment détectées des pertes d'hétérozygotie peu retrouvées dans la littérature antérieure sur les chromosomes 1p, 3p, 4p et 14q [39]. Une étude sur des lignées cellulaires de NB ont également identifiés des anomalies chromosomiques non reportées par CGH ou par FISH sur les chromosomes 4p, 6p, 8p, 8q, 11p, 12p, 16p, 18p et 18q [22]. Une autre étude sur lignées cellulaires et sur tumeurs primaires a quant à elle identifiée des pertes d'hétérozygotie sur les chromosomes 1p dans presque toutes leurs échantillons, et des LOH des chromosomes 10q et 14q dans une partie d'entre eux. Elle a même souligné la présence de disomie uniparentale (ou isodisomie, contribution inégale des parents pour une quantité totale de matériel chromosomique normale) sur le chromosome 14q, ce qui n'avait jamais été rapporté auparavant [118]. Par la suite, cette technique a permis de découvrir de nouveaux facteurs génétiques prédisposant à l'initiation de la tumeur, telles que des SNPs communs en 6p22 [75] et en 2q35 [16]. Certains gènes ont également été identifiés comme potentiellement impliqués dans le neuroblastome grâce au SNP, tels que *NBPF23* [28] et *BARD1* [16]. Une des études les plus récentes avec le SNP a permis d'identifier clairement de nouveaux groupes de risque, séparant les tumeurs avec délétions 11q dans un groupe de haut risque dans les cas sans amplification de *MYCN* [19]. La même étude a d'ailleurs établi grâce au SNP que la distribution des points de cassure sur les autres chromosomes était différente dans les tumeurs avec délétion 11q que dans les tumeurs avec amplification de *MYCN* [19]. Finalement, le même groupe a démontré que la plus petite région commune de délétion du 1p était différente dans ces deux mêmes groupes de tumeurs à haut risque [18, 19]. Bref, la technique SNP a ouvert la porte sur l'identification d'anomalies méconnues ou inconnues auparavant telles le 14q qu'il est tentant d'analyser plus en profondeur afin d'en discerner le rôle dans le neuroblastome.

5 HYPOTHÈSES ET BUTS

Le neuroblastome est une tumeur très hétérogène dont les facteurs prédictifs génétiques prennent de plus en plus d'importance pour la stratification des groupes de risque, influençant ainsi directement le traitement reçu par les patients. Ses anomalies doivent donc être recherchées systématiquement par les différents centres hospitaliers avec une technique efficace et précise. D'autre part, il est primordial d'améliorer la méthode de stratification des NB, surtout ceux inclus dans le groupe de risque intermédiaire, dans lequel il persiste une grande variabilité clinique. La découverte de nouveaux facteurs génétiques reliés à des caractéristiques cliniques dans des tumeurs n'ayant ni amplification de *MYCN*, ni délétion 1p serait une avancée majeure dans cette voie.

Nous proposons une étude comparative des techniques FISH et SNP pour la mise en évidence des anomalies génétiques ayant une valeur pronostique dans le neuroblastome. D'autre part, nous croyons que les anomalies du 14q pourraient être des facteurs pronostics dans le neuroblastome et qu'elles peuvent être associées à des anomalies du gène *AKT*.

Les objectifs de cette étude sont :

- Vérifier la pertinence de la recherche des anomalies génétiques classiques du neuroblastome avec la FISH.
- Effectuer une analyse génotypique complète par une technique puissante telle le SNP et comparer les résultats avec la FISH.
- Évaluer le potentiel pronostic du chromosome 14q en analysant si les anomalies de ce chromosome sont associées à des caractéristiques cliniques prédictives de l'évolution de la tumeur.
- Déterminer quels sont les gènes d'intérêt modifiés dans les anomalies du 14q
- Vérifier si les anomalies du 14q peuvent être associées à des anomalies du gène *AKT*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. COMITÉ D'ÉTHIQUE

L'approbation des comités d'évaluation scientifique et d'éthique de la recherche du CHU Ste-Justine a été reçue pour cette étude, ainsi que le consentement des patients.

2. SÉLECTION DES TUMEURS

Les listes fournies par le département d'oncologie clinique du CHU Ste-Justine (Montréal, Québec, Canada) ont permis de répertorier les patients traités et suivis au CHU Ste-Justine pour un neuroblastome entre 1994 et 2009. Les critères suivants ont été retenus pour la sélection des tumeurs :

- Données cliniques connues (âge au diagnostic, stade INSS, date du dernier contact ou date de décès) (tableau IV)
- Taille de la tumeur récupérée (exclusion des biopsies)
- Quantité suffisante de cellules tumorales

Les tumeurs opérées avant septembre 2008 étaient conservées congelées à une température de -80°C au CHU Ste-Justine. Les tumeurs à partir de septembre 2008 ont été utilisées à l'état frais pour la confection des lames de la FISH. Toutes les tumeurs ont été classifiées selon l'International Neuroblastoma Staging System (INSS). L'âge des patients varie entre 1 semaine et 94 mois.

3. FISH

3.1 CONFECTION DES LAMES

Dans un cryostat à une température de -20°C , les tumeurs ont été coupées avec un scalpel afin d'obtenir une surface lisse. Avec des pinces, la surface lisse a été appuyée sur une lame, créant une empreinte. Sans produire de chevauchement, plusieurs empreintes ont été effectuées dans une même zone de la lame, donnant ainsi une zone d'empreinte. Pour chaque prélèvement, deux zones d'empreinte étaient créées sur une même lame (figure 9) et deux lames ont été effectuées.

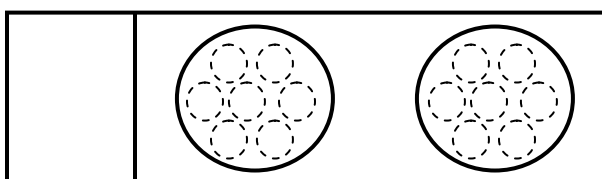


Figure 9. Schéma d'une lame sur laquelle ont été apposées des empreintes.

Lame comprenant deux zones d'empreinte comprenant plusieurs empreintes distinctes les unes des autres, mais rapprochées. Cercle pointillé : empreinte. Cercle noir : zone d'empreinte.

Les lames ont ensuite été séchées à l'air libre, puis mises dans du carnoy (voir appendices 1) pour fixation pendant 20 minutes. Finalement, des ronds délimitant les zones d'empreintes ont été gravés sur les lames. Les lames ont ensuite été visualisées en microscopie photonique afin de s'assurer de la présence de noyaux cellulaires, puis conservées au congélateur à -80°C . La journée avant la technique de la FISH, les lames ont été placées dans du carnoy pour la nuit.

Cette technique a été effectuée par l'auteure (Arsenault, M-P).

3.2 FISH INTERPHASIQUE

Le lendemain, les étapes de la FISH interphasique ont été débutées. La méthode de FISH sur noyaux se sépare en trois étapes distinctes.

3.2.1 PRÉ-TRAITEMENT

Les lames ont été posées dans une étuve à 37°C pendant 2 heures, puis ont été placées successivement dans six bains à 37°C dans l'ordre et les temps suivants :

- PBS (Phosphate Buffer Saline) (voir appendices 1), 5 minutes.
- Formaldéhyde dilué dans du PBS (solution de dénaturation), 5 minutes.
- PBS, 5 minutes.
- Éthanol 70%, 2 minutes.
- Éthanol 80%, 2 minutes.
- Éthanol 95%, 2 minutes.

Les bains d'éthanol à concentration croissante ont permis de déshydrater les lames.

3.2.2 DILUTIONS ET APPLICATION DES SONDÉS

Les sondes, conservées au congélateur à -20°C et emballées dans du papier d'aluminium afin de les protéger de la lumière, ont été décongelées dans un bain-marie à 37°C pendant 3 minutes puis passées au vortex quelques secondes. Les sondes ont toutes été commandées chez Vysis (Abbott Molecular, Des Plaines, Il) : LSI 1p36 / 1q25, LSI MYCN/CEP2, LSI MLL DUAL COLOR, LSI SMS, LSI RARA DUAL COLOR, LSI RARA / PML, LSI CEP17 et Miller-Dieker (tableau III). Pour une localisation détaillée des sondes, voir appendices 2.

Tableau III Sondes utilisées sur noyaux interphasiques en FISH pour vérifier la ploïdie et la présence d'anomalies dans les chromosomes 1, 2, 11 et 17

Sondes	Longueur (kb)	Site d'hybridation	Fluorochrome
Vysis LSI 1p36	435	1p36	SpectrumOrange
1q25	618	1q25	SpectrumGreen
Vysis LSI N-MYC	200	2p24	SpectrumGreen
CEP 2	Alpha satellite	2p11.1 - q11.1	SpectrumOrange
Vysis LSI MLL Dual Color	350 et 190	11q23	SpectrumGreen et SpectrumOrange
Vysis LSI Rara Dual Color	530	17q12 – q21	SpectrumGreen et SpectrumOrange
Vysis LSI Rara	700	17q21.1	SpectrumGreen
PML	500	15q22	SpectrumOrange
Vysis Miller-Dieker	110	17p13.3	SpectrumRed
Vysis LSI CEP 17	Alpha satellite	17p11.1 - q11.1	SpectrumAqua
Vysis LSI SMS	140	17p11.2	SpectrumOrange

Les sondes proviennent toutes de chez Vysis. Plusieurs types de sondes ont été utilisées (unique, en mélange, break apart). La longueur des sondes variait entre 140kb et 700kb. Quatre fluorochromes différents ont été utilisés (orange, vert, rouge, aqua).

Les sondes ont été préparées selon la dilution suivante : 1µL de sonde, 2µL d'eau déionisée filtrée et 7µL de tampon Vysis. Par la suite, les dilutions ont été placées sur chacune des zones d'empreinte des lames. Les lames ont été recouvertes d'une lamelle puis, après s'être assuré qu'aucune bulle d'air ne se retrouvait entre la lame et la lamelle, les lames ont été posées dans un Thermobrite™ (Abbot Molecular) contrôlant l'uniformité de la température pour un cycle de 10 minutes à 75°C (dénaturation et hybridation). Par la suite, les lames ont été mises dans une chambre de formamide dans l'étuve pour la nuit.

3.2.3 LAVAGE ET COLORATION

Le lendemain, les lames ont été passées dans des bains selon l'ordre, la température et le temps suivants :

- 2x SSC (saline-sodium citrate) (voir appendices 1), 37°C, 2 minutes. Les lamelles sont enlevées lors de ce bain.
- 0,4x SSC (voir appendices 1), 73°C, 2 minutes.
- 2x SSC, température ambiante, 1 minute.
- PBS, température ambiante, 30 secondes.

Les noyaux ont été visualisés par une contre-coloration au 4',6-diaminido-2-phénylindole (DAPI) (125ng/mL, Abbott Molecular).

Cette technique a été effectuée par l'auteure (Arsenault, M-P) conjointement avec les techniciennes du département de pathologie et cytogénétique du CHU Ste-Justine.

3.3 ANALYSE : DÉCOMPTE DES SONDÉS

L'analyse des lames a été faite par microscopie à fluorescence grâce au logiciel Cytovision 2.0 (Applied Imaging Corp). Afin de s'assurer de la véracité de la lecture, les signaux émis par les sondes ont été comptés par deux personnes séparément (une technicienne spécialisée en FISH du département de pathologie et cytogénétique du CHU Ste-Justine et l'auteure [Arsenault, M-P]). 100 cellules ont été comptées pour chaque sonde ou chaque ensemble de sondes. Les résultats ont été inscrits dans des formulaires préétablis (voir appendices 3).

3.4 ÉTABLIR UN PANEL

Les sondes FISH ont toutes été testées sur les noyaux interphasiques et en métaphase de cellules diploïdes sans anomalies (lymphocytes provenant de sang périphérique) avant de les tester sur les zones d'empreinte. Les sondes devaient répondre à trois critères : hybrider au bon endroit, être spécifique (ne pas hybrider à d'autres endroits), et émettre un signal de bonne intensité sur noyaux interphasiques. Les sondes répondant aux critères ont ensuite été testées sur des zones d'empreinte seule

et/ou en combinaison avec d'autres sondes afin de permettre une analyse plus efficace.

Les sondes du panel devaient pouvoir identifier les anomalies de structure actuellement utilisées pour le pronostic du neuroblastome (amplification du gène *MYCN*, gain 17q, délétion 1p et délétion 11q) et la ploïdie des tumeurs. Pour évaluer la ploïdie avec le moins d'incertitude possible, il faut connaître le nombre de chromosomes présents pour plusieurs chromosomes et pour tout le chromosome, pas seulement le bras chromosomique. Ainsi, il faut avoir une sonde sur le bras d'intérêt et une seconde sonde sur l'autre bras ou encore sur les centromères (plus grande variabilité). Dans un but de validation des résultats, les laboratoires de biochimie du CHU Ste-Justine ont fourni, pour les tumeurs dont l'information était disponible, la ploïdie telle qu'établie par la cytométrie de flux.

Afin de créer un panel intéressant pour la clinique, il doit être facile à appliquer, donc les sondes ont été en partie choisies parmi celles qui sont déjà utilisées en clinique. En outre, les lames doivent être lues facilement et dans un temps acceptable pour les techniciennes. Le temps de lecture d'une lame dépend de deux facteurs principaux : le nombre de lames à lire et la clarté des signaux émis (que les signaux soient faciles à visualiser). Puisque toutes les sondes individuelles donnaient des signaux suffisants sur noyaux interphasiques à base d'empreintes, l'objectif était d'utiliser le plus petit nombre de lames possibles.

4. SNP

4.1 EXTRACTION D'ADN

25 mg de chacune des tumeurs congelées ont été prélevés, puis broyés mécaniquement au polytron dans du PBS. L'ADN a été extrait des tumeurs en utilisant la méthode Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit). D'abord, un tampon de lyse et de la protéinase K ont été ajoutés aux tumeurs pour la lyse et l'inhibition des enzymes de dégradation de l'ADN. Puis, les tumeurs ont été mises à 56°C pour 4 heures. Après

l'incubation, un détergent a été ajouté afin d'enlever les membranes lipidiques et les tubes ont subi une seconde incubation 10 minutes à 70°C. De l'éthanol 100% a été ajouté pour précipiter l'ADN, puis la solution a été versée dans une colonne qui retient l'ADN. Les échantillons ont ensuite subi trois étapes de lavage successives afin de retirer l'ARN et les autres produits non désirables. Finalement, un tampon d'éluion a été ajouté afin de récupérer l'ADN de la colonne.

Cette technique a d'abord été effectuée par l'auteure (Arsenault, M-P). Pour quelques tumeurs, un supplément d'ADN a été nécessaire et l'extraction a été effectuée par l'associée de recherche du laboratoire (Nyalendo, C).

4.2 QUANTIFICATION ET VÉRIFICATION DE L'ADN

L'ADN a été dosé en utilisant le spectrophotomètre Nanodrop à 260 nm. Les échantillons devaient avoir un volume minimum de 20µL à une concentration de 20ng/µL. Un ratio 260/280 (acides nucléiques/protéines) entre 1,5 et 1,80 était recherché afin d'obtenir un échantillon d'ADN pur, sans contamination de protéines. Le blanc a été fait avec de l'eau sans ADN ni ARNase. Finalement, une électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% contenant du bromure d'éthidium a été effectuée pour évaluer la qualité (longueur des fragments) de l'ADN. L'ADN est conservé au congélateur à -80°C.

Cette technique a été effectuée par l'auteure (Arsenault, M-P).

4.3 SNP

La technique SNP a été effectuée par le centre d'innovation Génome Québec de McGill (Montréal, Québec, Canada). Les puces « Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 » ont été utilisées selon la méthode décrite par le manufacturier. La matrice 6.0 contenant 945 826 sondes non polymorphiques pour évaluer le nombre de copies et 906 000 sondes polymorphiques pour évaluer l'information allélique et le nombre de copies.

La technique se divise en plusieurs étapes. La première étape a été l'amplification de l'ADN génomique (figure 10). Pour se faire, l'ADN a d'abord été digéré avec l'enzyme de restriction Sty I (reconnaît les séquences 5'-CCWWGG-3'), puis lié à un adaptateur commun avec l'ADN ligase T4. Après la liaison, l'ADN a subi une réaction en chaîne par polymérase (PCR) amplifiant préférentiellement les fragments d'ADN situés entre 200 et 1 100 paires de base en utilisant l'ADN polymérase Taq TITANIUM™. L'ADN a ensuite subi un deuxième cycle de PCR, mais cette fois avec l'enzyme de restriction Nsp1 (reconnaît les séquences 5'-CATG-3'). Les produits ont ensuite été fragmentés avec une DNase I et marqués en utilisant la transférase déoxynucléotidyle terminale (TdT).

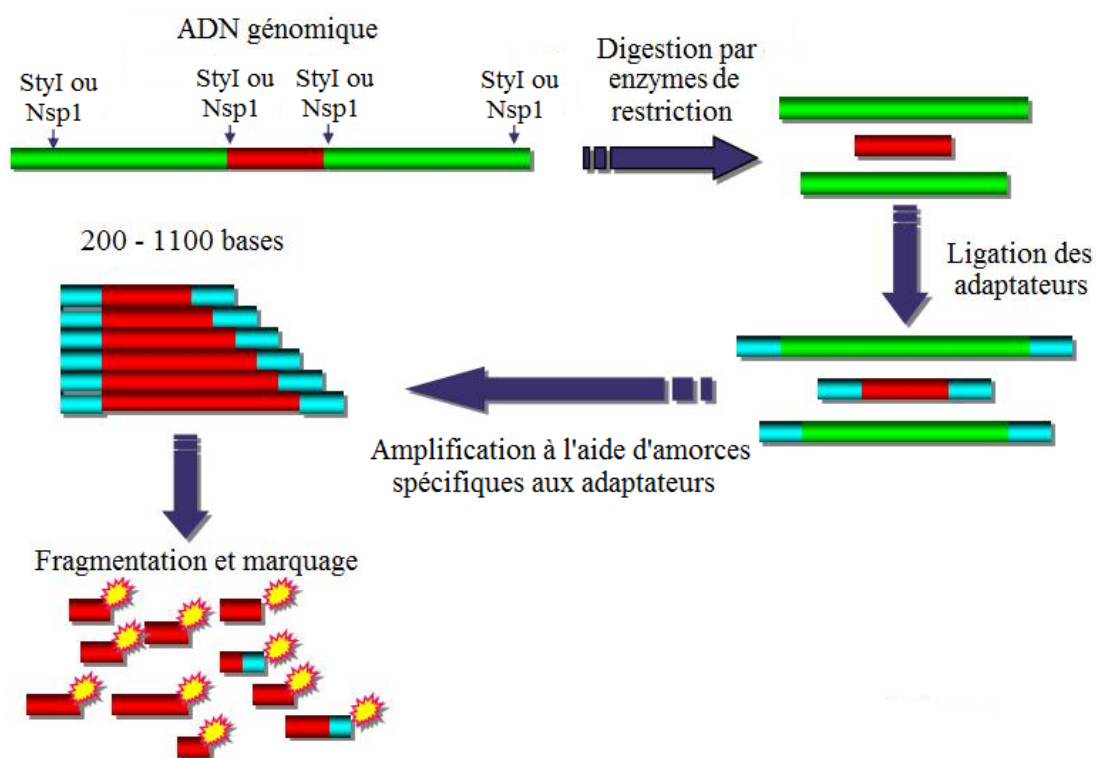


Figure 10. Premières étapes du SNP : amplification de l'ADN et marquage

La digestion enzymatique de l'ADN est la première étape du PCR, suivie d'une ligation des adaptateurs, puis de multiples passages dans des cycles thermiques créant une réplification de l'ADN. L'ADN est ensuite fragmenté et marqué.

Adapté de Affymetrix.

La deuxième étape est la discrimination allélique (figure 12, B). En utilisant le thermocycleur « GeneAmp PCR System 9700 », l'ADN marqué a ensuite été hybridé à la matrice. La matrice contient des millions de puces d'ADN. Il existe 2 types de puces : les puces de référence avec correspondance parfaite à la séquence cible (« perfect match ») et les puces partenaires qui diffèrent des puces de référence par une base seulement dans le centre de la séquence (« mismatch »). En fait, les puces sont disposées en quatuor : la puce de référence pour les allèles A et B et les puces partenaires pour les allèles A et B, ce qui permet de déterminer trois génotypes distincts (AA, AB et BB) en utilisant l'intensité du signal pour chaque puce du quatuor. L'ADN homozygote pour la séquence du SNP (AA) va s'hybrider fortement à la puce de référence, alors que les hétérozygotes (AB) ou les homozygotes différents (BB) vont avoir des modèles d'hybridation différents au nucléotide central (fluorescence plus faible), indiquant un niveau relatif d'hybridation avec la puce (figure 11). L'intensité du signal dépend donc de l'affinité entre la l'ADN d'intérêt et la puce et sur la quantité d'ADN de l'échantillon.

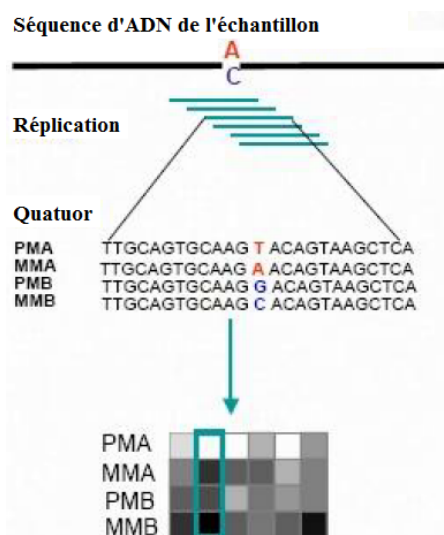


Figure 11. Hybridation différentielle selon le génotype

La séquence d'ADN de l'échantillon, après répliquation par PCR, est mise en contact avec plusieurs séquences d'ADN de la matrice, pour lesquelles il a quatre possibilités : les puces de référence A ou B ou les puces partenaires A ou B. La liaison avec une puce parfaitement complémentaire entraîne une fluorescence plus marquée (ici carreaux blancs), alors que celle avec les différences d'un nucléotide donne une fluorescence plus faible (ici carreaux noirs et variation de gris) PMA = perfect match A, MMA : mismatch A, PMB = perfect match B, MMB : mismatch B. Adapté de Affymetrix.

La troisième étape est la détection allélique dans laquelle les échantillons ont été lavés afin d'éliminer l'ADN non hybridé, puis colorés. Finalement, la fluorescence émise par l'hybridation différentielle a été analysée par le scan « GeneChip Scanner 3000 7G ». Deux informations sont obtenues par l'émission de fluorescence, puisque le SNP combine le génotype (classification des locus polymorphiques comme homozygote ou hétérozygote) et l'analyse du nombre de copies (quantité d'ADN). La première établit le génotype (profil allélique) de l'échantillon d'intérêt par l'intensité différente des signaux fluorescents émis pour chaque génotype (AA, AB ou BB) de chaque SNP. En ce qui a trait à l'analyse du nombre de copies, il est évalué par l'intensité moyenne de la fluorescence émise par la liaison de l'ADN d'intérêt lié aux puces de complémentarité parfaite pour un même locus. Pour que cette mesure fonctionne, il faut considérer que l'intensité de la fluorescence est proportionnelle au nombre de copies des séquences d'ADN dans l'échantillon. La fluorescence est d'abord évaluée puce par puce puis représentée sur le génome en fonction de la position génomique relative de chaque puce. Par la suite, l'intensité de la fluorescence des puces dans un même set est comparée et combinée afin d'estimer une mesure d'expression. Suite à plusieurs étapes de normalisation afin de minimiser les variations induites par la technique et faire ressortir les variations d'intérêt (donc celles entre l'ADN testé et l'ADN de référence), un seuil d'intensité normal pour chaque puce est établi. Il est donc possible de déterminer les régions génomiques où l'intensité diverge du seuil moyen, qui représentent les régions de variations du nombre de copies (gains, pertes). Ainsi, le SNP n'indique pas l'abondance d'un gène dans un échantillon, car il ne compte pas le nombre de signaux, mais plutôt l'intensité de la fluorescence qui reflète l'abondance relative d'un gène par rapport aux autres séquences d'ADN de la matrice.

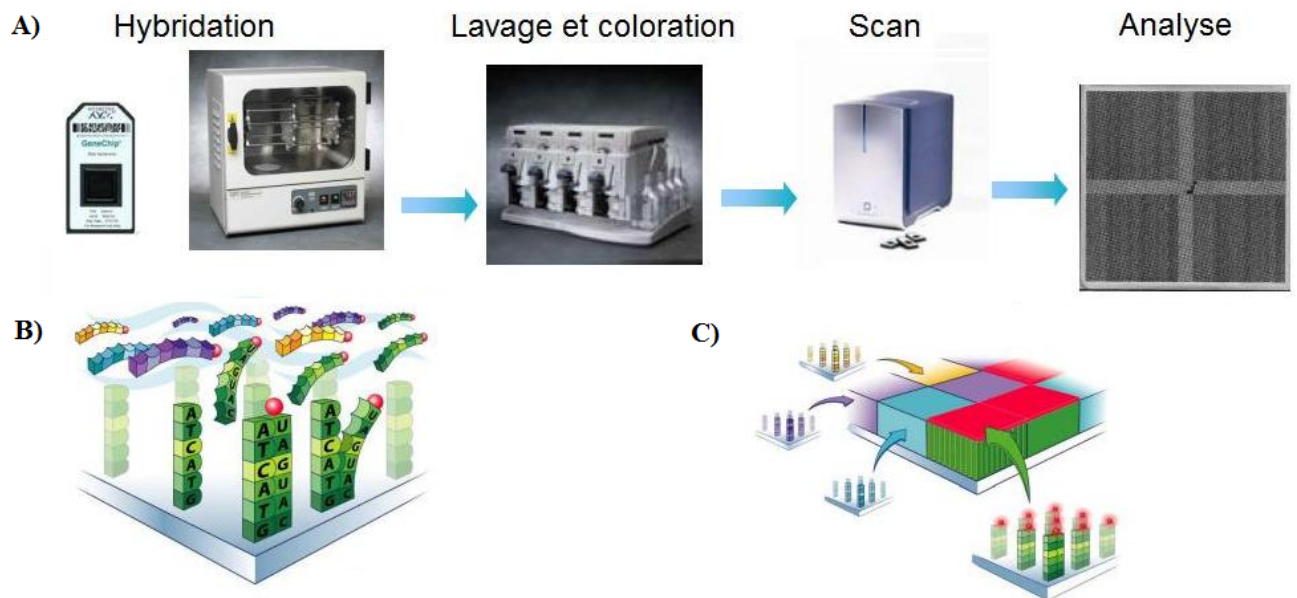


Figure 12. Dernières étapes du SNP : hybridation, coloration et analyse

A) Une fois la matrice chargée avec les échantillons, elle est mise à hybrider dans une machine gérant les cycles thermiques, basée sur une hybridation différentielle entre l'ADN parfaitement complémentaire et les variantes de l'ADN. La matrice est ensuite lavée et colorée afin d'être reconnue lorsqu'elle est passée au scan. Il est enfin possible d'analyser les résultats ressortis par le scan. B) Représentation de l'hybridation : chaque séquence d'ADN est présente plusieurs fois dans la matrice et varie des autres séquences d'ADN par un seul nucléotide. Ici les différentes séquences possibles sont indiquées par différentes couleurs (vert, jaune, mauve et bleu). Les séquences d'ADN d'intérêt vont se lier aux séquences qui lui sont complémentaires, dont la séquence parfaitement complémentaire (ici : le vert). C) Lors de l'analyse, les séquences auxquelles l'ADN d'intérêt se sont liées vont émettre de la fluorescence, qui sera plus forte pour les séquences parfaitement complémentaires (ici en rouge).

Adapté d'un document fourni par Affymetrix.

4.4 ANALYSE

Les données brutes analysées par le scan (intensité et nombre des signaux fluorescents) ont été transformées en données analysables (génotypes et nombre de copies) à l'aide du logiciel Genotyping Console 4.0 (GTC 4.0, Affymetrix). Le génotype initial a été effectué par l'algorithme Birdseed, qui estime l'intensité du signal pour chaque allèle de chaque SNP en calculant la somme des signaux provenant des matchs parfaits et soustrayant la somme des signaux des matchs imparfaits et assigne le génotype AA, AB ou BB à chaque échantillon contenant 2 allèles. À partir du nombre de signaux déterminé par l'algorithme Birdseed, les ratios Log_2 (qui donnent une distribution plus gaussienne) sont calculés entre l'ADN tumoral et l'ADN de référence pour chaque SNP. Des signaux lisses (« smooth signal ») sont ensuite construits en utilisant la moyenne des ratios Log_2 des sondes environnantes. Le nombre de copie est quant à lui calculé par un modèle statistique (modèle de Markov caché) selon le rapport de la fluorescence de chaque séquence d'ADN sur le ratio de fluorescence moyen de la lecture globale. Ce modèle statistique permet de diminuer la variation entre les différents signaux tout en augmentant le bruit de fond.

Suite à cette transformation des données, le logiciel d'analyse Chromosome Analysis Suite (ChAS) a été utilisé (figure 13). Ce logiciel permet d'avoir une vue d'ensemble du génome tout en donnant la possibilité de sélectionner facilement une zone d'intérêt grâce à une zone de sélection directement sur le chromosome et ce, pour plusieurs échantillons simultanément. Il est également possible de faire la recherche d'un gène d'intérêt et de se rendre à sa localisation précise automatiquement ou encore d'afficher les variants décrits dans la littérature.

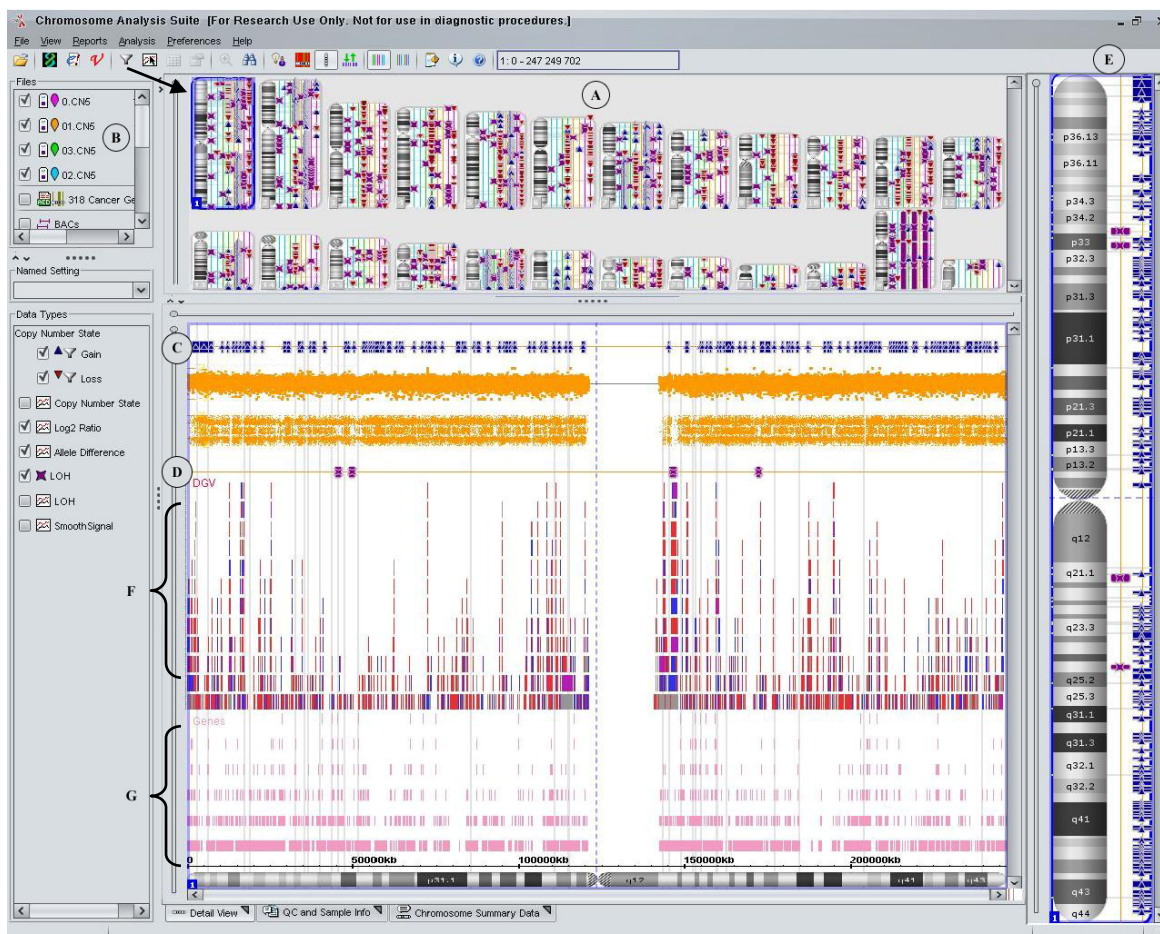


Figure 13. Interface principal du logiciel d'analyse ChAS

Le logiciel ChAS permet d'avoir une vue d'ensemble du génome et ce, chromosome par chromosome (A), pour tous les échantillons sélectionnés (B). En sélectionnant un chromosome d'intérêt, ici le chromosome 1 (flèche), il est également possible d'observer les gains et les pertes (C) ainsi que les LOH (D) pour ce chromosome ou pour une région de celui-ci en encadrant la région voulue sur le schéma du chromosome à la droite de l'image (E). De plus, il est possible d'indiquer les variants connus pour ces sites (F) et les gènes se retrouvant dans les régions des anomalies (G).

Le logiciel ChAS a permis de visualiser les SNPs de chaque chromosome sous la forme d'un nuage de points où l'axe des abscisses représente la déviation allélique alors que l'axe des ordonnées correspond à la distance du point par rapport à son origine (figure 14). Afin d'analyser les anomalies génétiques, trois graphiques peuvent être utilisés; un représentant le génotype et deux représentant le nombre de copies. Pour le génotype, chaque locus SNP y apparaît selon son profil génomique : soit homozygote AA, homozygote BB ou hétérozygote AB. En ce qui à trait au nombre de copies, le premier graphique correspond au **log** de l'intensité des signaux, alors que le second est le signal moyen du premier graphique. Une anomalie a été considérée significative si elle était supérieure à 100 kb et devait se situer dans une région sans variant connu dans la population normale.

Cette analyse a été effectuée par l'auteure (Arsenault, M-P).

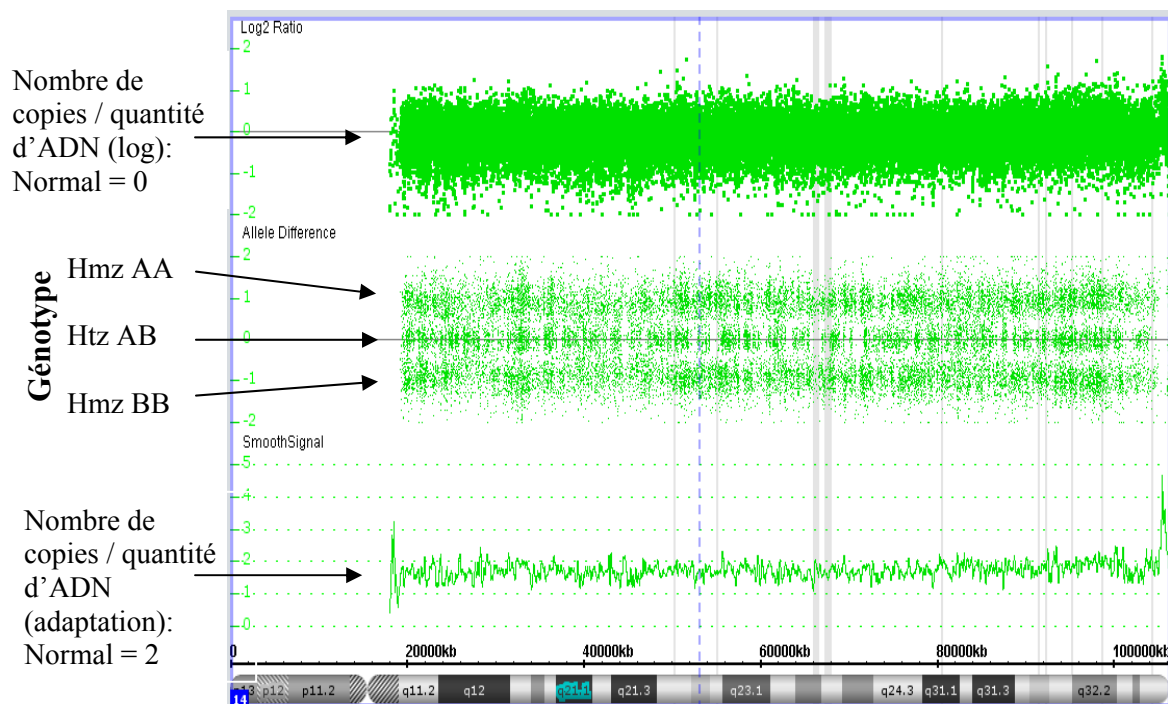


Figure 14. Résultats du SNP sous forme de nuages de points

Le résultat de l'hybridation *in situ* est imagé sous forme de nuages de points, dans cette figure pour un chromosome 14 sans anomalie. Le génotype est présenté sous forme de profil allélique (allelic difference) de chaque SNP, pouvant être homozygote AA (Hmz AA), BB (Hmz BB) ou hétérozygote AB (Htz AB). La quantité d'ADN se retrouve sous deux formes différentes : logarithmique (Log2 Ratio) ou une adaptation de ce logarithme (signal lisse / smooth signal).

4.5 ANALYSES STATISTIQUES

Le test chi-carré a été utilisé afin de vérifier l'indépendance entre les données cliniques et le facteur d'intérêt. Une valeur a été considérée statistiquement significative si sa valeur p est inférieure à 0,05. Les statistiques ont été effectuées avec le logiciel Prism 4 (Graph Pad Software inc., États-Unis).

RÉSULTATS

1. DONNÉES CLINIQUES DES TUMEURS UTILISÉES

Au total, 40 tumeurs ont été utilisées : 12 communes au FISH et au SNP, 9 uniquement pour la FISH et 19 uniquement pour le SNP. Parmi ces 40 tumeurs (voir tableau IV), 7 étaient des stades 1 (17,5%), 8 stades 2 (20%), 5 stades 3 (12,5%), 17 stades 4 (42,5%) et 3 stades 4S (7,5%). Vingt patients étaient de sexe féminin et 20 de sexe masculin. Vingt-cinq patients étaient âgés de plus de 12 mois et 12 avaient moins de 12 mois lors du diagnostic. Selon les données recueillies lors du dernier suivi ou du dernier événement en date du mois d'août 2010, 12 sont décédés suite à leur maladie, alors que 28 ont survécu. Tous les patients décédés avaient un neuroblastome de stade 4 et étaient âgés de plus de 12 mois. Finalement, selon les données reçues du COG, 2 tumeurs présentaient l'amplification du gène *MYCN*. Pour le détail des données cliniques pour chacune des tumeurs, voir appendices 4.

Tableau IV Répartition du nombre de tumeurs selon le sexe, le stade, l'âge, le statut de *MYCN* et l'évolution en date du mois d'août 2010

Données cliniques		Nombre de patients
Sexe	F	20
	M	20
Stade	1	7
	2	8
	3	5
	4	17
	4s	3
Âge	< 12 mois	15
	> 12 mois	25
<i>MYCN</i> (COG)	na	28
	a	2
	ns	10
Évolution	Survie	28
	Décès	12

Sur les 40 patients dont les tumeurs ont été utilisées au FISH et/ou au SNP, 20 étaient de sexe féminin et 20 de sexe masculin. 25 avaient 12 mois et plus, alors que 15 avaient moins de 12 mois. 12 sont décédés, alors que 28 ont survécu. Sexe : F= féminin, M= masculin. *MYCN* COG : a= amplifié, na = non amplifié, ns = non spécifié.

La technique du SNP a été effectuée sur 36 de ces 40 tumeurs. Sur ces 36 tumeurs, 5 étaient de stade 1 (14%), 7 stades 2 (19%), 5 stades 3 (18%), 16 stades 4 (45%) et 3 stades 4S (8%) (figure 15).

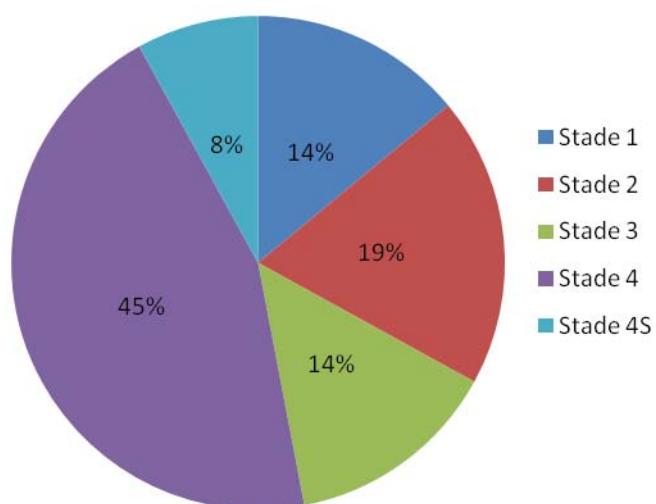


Figure 15. Représentation de chaque stade dans l'ensemble des tumeurs utilisées pour le SNP

Le stade INSS le plus représenté dans l'échantillon est le stade 4 présent dans presque la moitié des tumeurs (45%), suivi par le stade 2 (19%), puis les stades 1 et 3 ont le même nombre de tumeurs (14%). Le stade le moins représenté est le stade 4S (8%).

2. ZONES D'EMPREINTE SUR LES LAMES

En septembre 2008, 63 tumeurs étaient conservées congelées à -80°C au CHU Ste-Justine. De ces 63 tumeurs, seulement 28 ont pu être utilisées pour faire des zones d'empreinte sur les lames. Pour une majorité de ces tumeurs, la raison les ayant éliminées est le manque de matériel, c'est-à-dire la petite taille de l'échantillon, qui empêchait une bonne manipulation pour faire l'empreinte. Pour les tumeurs restantes, c'est une combinaison de la grosseur de l'échantillon et de la technique de congélation utilisant de la colle qui explique leur non utilisation. Cette colle entourant l'échantillon était enlevée avec un scalpel lorsqu'elle était présente en petite quantité. Toutefois, lorsqu'une trop grande quantité de colle entourait l'échantillon et que celui-ci était relativement petit (même s'il avait pu être utilisé sans colle), il était parfois impossible de tailler l'échantillon afin de pouvoir bien le manipuler, ce qui réduisait d'autant plus le nombre de tumeurs utilisables.

Sur les 28 tumeurs utilisées pour faire des empreintes, seulement 12 (43%) ont pu être utilisées pour la FISH. Deux causes peuvent expliquer l'élimination des 16 tumeurs. Certains échantillons, malgré plusieurs essais, n'avaient que très peu ou pas de noyaux lorsque les lames ont été visualisées (11/16, 69%). Sur les autres échantillons, ce n'étaient pas des noyaux qui étaient visualisés au microscope photonique, mais plutôt des lignes texturées et ne reproduisant pas de motifs particuliers, étant concentriques ou enchevêtrées les unes sur les autres ou un mélange des deux, et ce, malgré plusieurs essais (5/16, 31%).

Aux tumeurs congelées s'ajoutent également 9 neuroblastomes opérés à Ste-Justine entre septembre 2008 et décembre 2009. Les 9 tumeurs ont pu être adéquatement apposées sur les lames et utilisées pour la FISH, ce qui rend le taux de réussite de confection de lames nettement supérieur avec les tumeurs à l'état frais par rapport aux tumeurs congelées. Au total, 21 tumeurs ont pu être mises sur lame et utilisées pour la FISH.

3. FISH - ÉTABLIR LE PANEL DE SONDÉS

Dans un premier temps, une tumeur avec beaucoup de matériel (grande quantité de tumeur et beaucoup de noyaux cellulaires) a été utilisée pour tester les différentes combinaisons de sondes (figure 16).

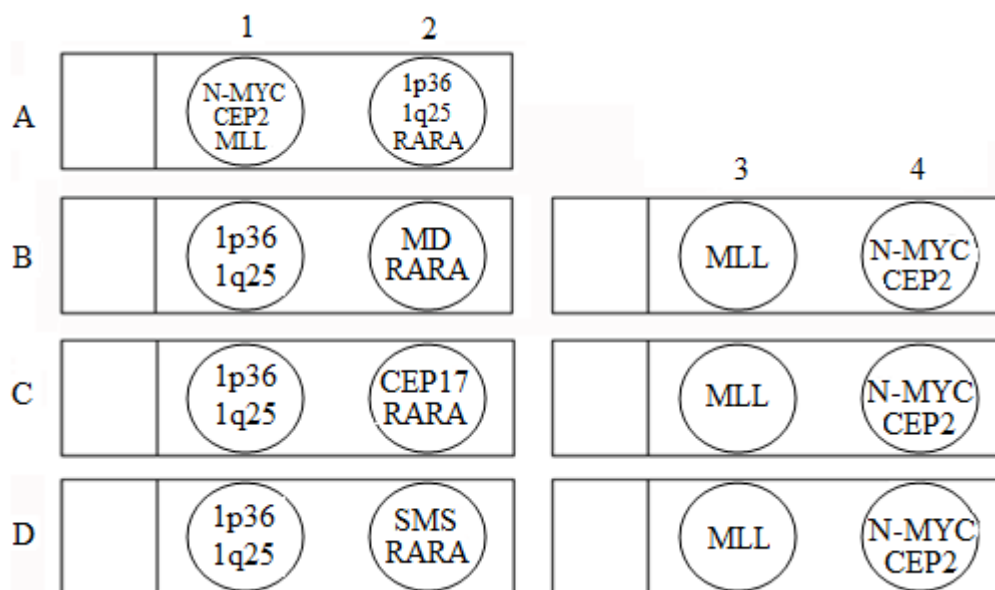


Figure 16. Schéma des différentes combinaisons de sondes effectuées sur les zones d'empreintes.

Le premier essai comportait une lame seulement (A), alors que les trois autres comportaient deux lames (B, C, D). Au total, neuf sondes ont été utilisées pour former les différents essais. Lettres : essais en ordre chronologique. Chiffres : numéros des empreintes. MD = Miller-Dieker. SMS = Smith-Magenis. MLL : myéloïde/lymphoïde ou « mixed-lineage leukemia ».

Le premier essai a été de combiner toutes les sondes afin de n'utiliser qu'une seule lame (figure 16, A). Dans une cellule diploïde, les cellules de la première empreinte contenaient 2 signaux verts (sonde N-MYC), 2 signaux orange (sonde CEP2) et 2 signaux jaunes (sonde MLL) pour la détection de la del(11q). Quant aux cellules de la deuxième empreinte, elles contenaient 2 signaux orange (sonde 1p36), 2 signaux verts (sonde 1q25) et 2 signaux jaunes (sonde RARA) pour la détection du 17q.

Le second essai (figure 16, B) a donc été fait sur deux lames différentes. Puisque quatre zones d’empreinte étaient disponibles, elles ont pu être séparées. Les sondes utilisées pour le premier essai ont été conservées. Ainsi, l’empreinte 1 contenait 2 signaux orange (sonde 1p36) et 2 signaux verts (sonde 1q25), alors que l’empreinte 2 contenait 2 signaux jaunes (sonde RARA Dual Color) et deux signaux rouges (sonde Miller-Dieker). L’empreinte 3 contenait seulement 2 signaux jaunes (sonde MLL Dual Color), alors que l’empreinte 4 contenait 2 signaux verts (sonde N-MYC) et deux signaux orange (sonde CEP2). Les empreintes 1, 3 et 4 (figure 17 : AI, BI et CI) avaient une bonne intensité et étaient faciles à compter. Toutefois, la sonde rouge Miller-Dieker était difficile à percevoir.

L’essai suivant (figure 16, C) a conservé les mêmes sondes, excepté la Miller-Dieker qui a été changée pour une autre sonde disponible s’hybridant sur les centromères du chromosome 17 : la sonde CEP17 donnant deux signaux bleus. Cette sonde a été moins appréciée; étant plus difficile à voir, elle augmentait le temps de lecture. Pour le quatrième essai (figure 16, D), la sonde CEP17 a été changée pour la sonde SMS (sonde Smith-Magenis) qui hybride également sur le 17p et donne deux signaux orange. La sonde SMS donnait un signal bien visible et facile à compter. Le panel qui a été retenu (figure 16, D et figure 17 colonne I) était donc composé des sondes suivantes : 1p36 et 1q25 (empreinte 1), SMS et RARA (empreinte 2), MLL (empreinte 3), ainsi que N-MYC et CEP2 (empreinte 4).

Dans un deuxième temps, le panel retenu a été étendu sur les autres lames (20) afin de vérifier s’il était applicable à plus grande échelle. Les 9 tumeurs à l’état frais ont bien fonctionné au FISH. Cependant, sur les 12 tumeurs congelées qui ont été utilisées pour faire la FISH, 5 (5/12, 42%) n’avaient soit aucune sonde visible, soit avaient des sondes très pâles ou dont l’intensité fluctuaient beaucoup entre les noyaux. Le panel a donc été réussi dans 16 tumeurs, pour un taux de réussite de 76% (16/21, 76%).

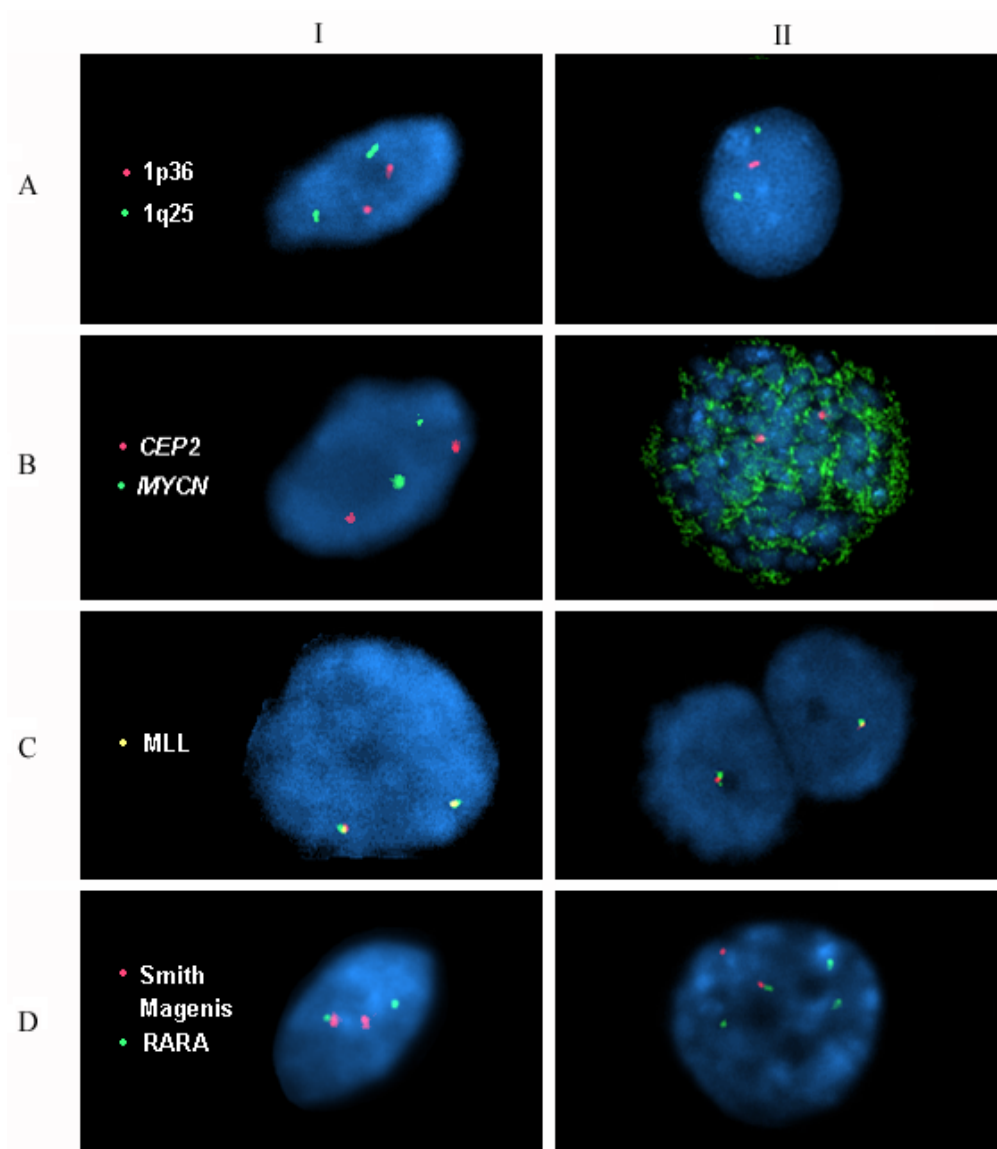


Figure 17. Hybridation *in situ* en fluorescence des sondes sélectionnées

Hybridation sur des cellules diploïdes normales (I), sur des cellules diploïdes avec anomalie de structure (II) des empreintes de tissu tumoral (A) chromosome 1 normal et délétion 1p36, (B) chromosome 2 et amplification du gène *MYCN*, (C), chromosome 11 et délétion 11q23 (deux cellules), (D) chromosome 17 et délétion 17q.

4. FISH - RÉSULTATS

Les résultats du panel ont donc été recueillis pour 16 échantillons (tableau V). Les résultats inscrits sont le nombre de sondes retrouvées pour le clone principal (représentant au moins 20% des cellules; pour le pourcentage exact voir appendices 5). Les conclusions suggérées reflètent l'interprétation la plus probable suite à l'analyse du nombre de sondes dans le contexte du neuroblastome. Les tumeurs 17 et 18 (2/16, 12,5%) ne présentent aucune des anomalies de structure recherchées et sont diploïdes. Deux autres tumeurs, les numéros 15 et 16 (2/16, 12,5%), ne présentent pas d'anomalies de structure, mais ont une ploïdie augmentée. Au contraire, quatre tumeurs, numéros 2, 10, 13 et 19 (4/16, 25%), sont diploïdes, mais présentent plusieurs anomalies de structure. Finalement, 50% des tumeurs (8/16) présentent des anomalies de structure et une augmentation de la ploïdie.

Tableau V Nombre de signaux pour chaque sonde utilisée en FISH ainsi que la conclusion suggérée par ses résultats pour les 16 tumeurs

#	MYCN	1p36	1q35	CEP2	2p23	11q23	17 p11	17 q21	Conclusion suggérée, FISH seulement	Ploïdie	Conclusion suggérée corrigée
1	na	3	4	4	4	1	5	5	Para-tétraploïde, del(1p), del(11q)x3, +17	Triploïde	Triploïde, g(1q), g(2p), del(11q)x2, +17, +17
2	na	2	2	2	2	1	2	3	Diploïde, del(11q), g(17q)	Diploïdie	Diploïde, del(11q), g(17q)
3	na	3	3	3	3	2	4	4	Triploïde, del(11q), +17	nd	nd
7	na	3	3	3	3	3	3	3	Triploïde	Triploïde	Triploïde
8	na	2	2	3	3	2	3	3	Triploïde, -1, del(11q)	Triploïde	Triploïde, -1, del(11q)
9	na	2	2	3	3	3	2	2	Triploïde, -1, -17	Diploïde	Diploïde, g(2p), g(11q)
10	a	2	4	---	---	2	4	6	Para-tétraploïde, del(1p), amp(MYCN), del(11q)x2, +i(17q)	Triploïde	Triploïde, +1, del(1p)x2, del(11q), +17, +i(17q)
13	a	1	2	---	---	2	2	3	Diploïde, del(1p), amp(MYCN), g(17q)	Diploïdie	Diploïde, del(1p), amp(MYCN), g(17q)
14	na	3	3	3	3	3	3	4	Triploïde, +17q	Triploïde	Triploïde, +17q
15	na	3	3	5	5	2	4	4	Para-tétraploïde, -1, g(2p), del(11q)x2	Triploïdie	Triploïde, g(2p)x2, del(11q), +17
16	na	2	2	2	2	2	2	2	Diploïde	nd	nd
17	na	2	2	2	2	2	2	2	Diploïde	Diploïde	Diploïde
18	na	2	2	2	2	2	2	2	Diploïde	Diploïde	Diploïde
19	na	2	2	2	2	2	2	2	Diploïde	nd	nd
20	na	3	3	3	3	2	3	3	Triploïde, del(11q)	nd	nd
21	na	3	3	3	3	2	4	4	Triploïde, del(11q), +17	Diploïde	Diploïde, +1, g(2p), +17

Les sondes situées sur le bras 2p n'ont pas pu être visualisées sur les deux tumeurs avec amplification de *MYCN*. La ploïdie telle que calculée en cytométrie de flux concorde dans quatre cas sur 8 avec la conclusion suggérée par la FISH uniquement. a = amplifié, na = non amplifié, --- = signaux non comptés dû à la présence de l'amplification de *MYCN*, nd = données non disponibles. del(#) : délétion (zone de délétion), g(#) : gain (zone de gain), +(#) : gain d'un chromosome complet (numéro du chromosome), -(#) : perte d'un chromosome complet (numéro du chromosome).

5. SNP - RÉSULTATS

L'interprétation du SNP s'est basée sur les définitions suivantes des différentes anomalies génétiques.

5.1 AMPLIFICATION

Une amplification est un segment chromosomique retrouvé en 4 copies minimum, tel que démontré par un ratio Log2 de 2 et un signal lisse à 4 ou 5 (cinq étant le rapport maximal, peu importe la quantité d'ADN) associés à un décalage de la fréquence allélique (déséquilibre allélique) (figure 18, A). Une amplification est indiquée schématiquement par un rectangle bleu foncé par le logiciel ChAS.

5.2 GAIN

Un gain est un segment chromosomique retrouvé en au moins une copie de plus que la ploïdie qui a été déterminée. Pour une tumeur diploïde, le gain d'un segment est démontré par un Log2 à 1 et à un signal lisse à 3 associés à un changement du statut hétérozygote qui peut maintenant avoir deux génotypes : AAB ou BBA (figure 18, C). Il est indiqué schématiquement par un rectangle bleu par le logiciel ChAS.

5.3 DÉLÉTION

Une délétion est définie comme une perte d'un segment tel qu'indiqué par un ratio Log2 et un signal lisse diminués (respectivement à -1 et 1) et associé à une perte du statut hétérozygote AB (figure 18, B). Elle est schématisée par un rectangle rouge par le logiciel.

5.4 CN-LOH

Une CN-LOH est définie comme un débalancement allélique sans changement du nombre de copies (hémizygotie), tel que démontré par une perte du statut hétérozygote AB (Htz AB) et un ratio Log2 et un signal lisse inchangés (figure 18, D). Autrement dit, une CN-LOH peut être établie lorsque plusieurs locus polymorphiques consécutifs ont un génotype homozygote, mais que leur nombre de copies demeure 2 (donc diploïde), ce qui la diffère d'une délétion. Les anomalies

perçues par l'interprétation des nuages de point (Log_2 Ratio et Allele Difference) correspondent aux anomalies schématisées par l'analyse du logiciel ChAS (Copy Number State (segments)).

5.5 PLOÏDIE

La ploïdie est déterminée par un gain complet de la majorité des chromosomes. Les graphiques ratio Log_2 , signal lisse et génotype (profil allélique) démontrent les mêmes modifications que pour les gains intrachromosomiques, mais sur tout le chromosome et ce, pour plusieurs chromosomes. Dans le cas d'une triploïdie par exemple, le Log_2 est à 1, le signal lisse est à 3 et le statut hétérozygote a deux génotypes (AAB ou BBA) pour tout le chromosome (figure 18, C) et ce, sur la majorité des chromosomes.

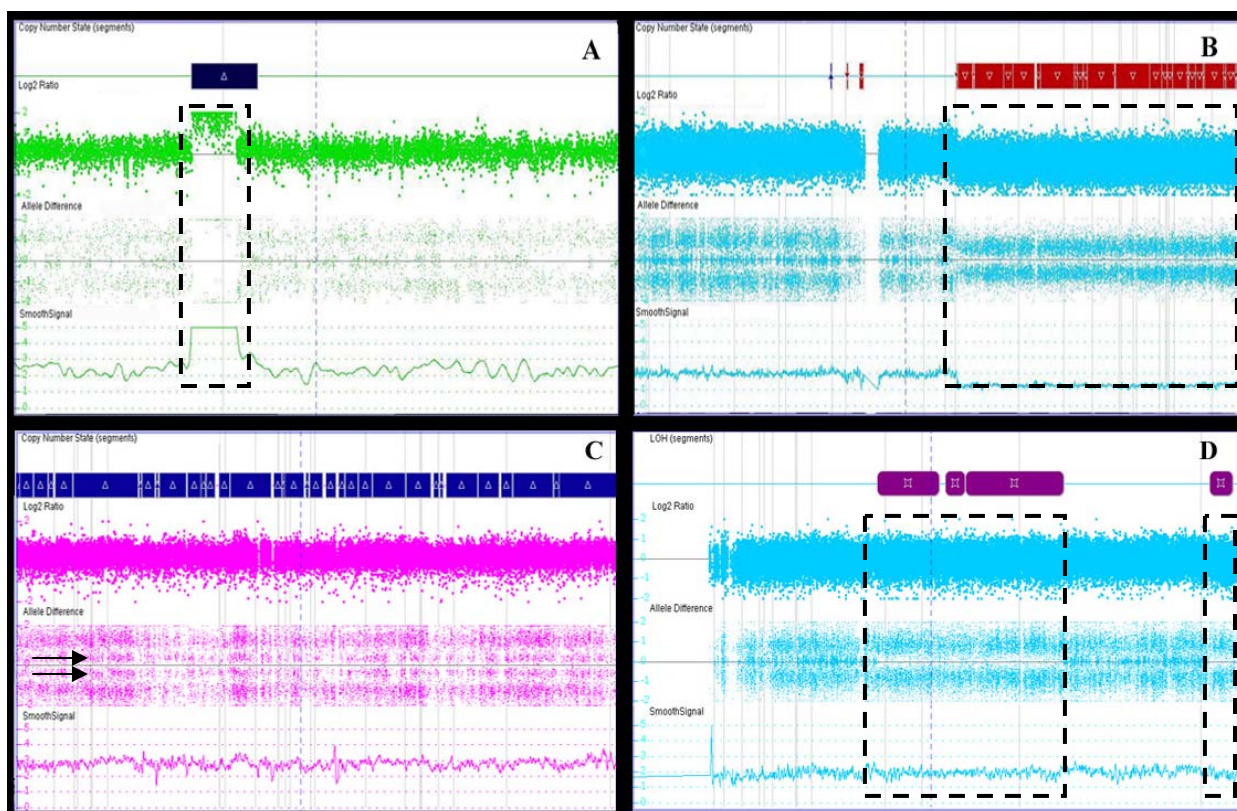


Figure 18. Exemple d'anomalies retrouvées au SNP

Les nuages de points (Log2 Ratio), la différence allélique (Allelic Difference) et le signal lisse (Smooth signal) démontrent bien les différents types d'anomalies retrouvées dans les tumeurs. Une amplification avec augmentation du nombre de copies (Log2 Ratio et Smooth Signal) ainsi qu'un génotype aux extrêmes de l'homozygotie due à la très grande quantité d'ADN (Allelic Difference) (A), une délétion avec un nombre de copies diminué (Log2 Ratio et Smooth Signal) avec une perte du statut hétérozygote (Allelic Difference) (B), un gain avec un nombre de copies augmenté (Log2 Ratio et Smooth Signal) ainsi qu'un dédoublement du profil allélique pour le statut hétérozygote (flèches, Allelic Difference) (C) et une CN-LOH avec un nombre de copie conservé (Log2 Ratio et Smooth Signal inchangé), mais avec une perte du statut hétérozygote (Allelic Difference) (D). Les zones encadrées en pointillé en A, B et D délimitent les zones d'anomalies.

La première partie de l'analyse des résultats a porté sur les anomalies fréquentes du neuroblastome décrites précédemment. L'anomalie la plus fréquente dans notre échantillon est la délétion 11q, retrouvée dans 43% des tumeurs (tableau VI). Elle est suivie par le gain 17q présente dans 33% des tumeurs, alors que la délétion 1p a été vue dans 14% des tumeurs. Finalement, l'amplification de *MYCN* a été retrouvée dans 17% des tumeurs. Le pourcentage de tumeurs présentant ces anomalies a été comparé à ce qui est habituellement retrouvé dans la littérature (tableau VI). Il en ressort que les résultats obtenus sont globalement concordants avec la littérature.

Tableau VI Pourcentages comparés entre les données obtenues en SNP et les données de la littérature pour les anomalies fréquemment retrouvées dans le neuroblastome

Anomalie	Nombre de tumeurs	Pourcentage (sur 36)	Pourcentage dans la littérature	Références
Amplification de <i>MYCN</i>	6	17%	20%	[10, 50]
Gain 17q	12	33%	50 - 75%	[8]
Délétion 1p	5	14%	25 - 35%	[7, 10]
Délétion 11q	11	43%	40- 45%	[10]

L'amplification de *MYCN* était dans 17% des tumeurs de notre échantillon, par rapport à une moyenne de 20% dans la littérature. Le gain 17q se retrouvait dans 33% par rapport à une représentation de 50-75% dans la littérature. Finalement, les délétions 1p et 11q étaient présents à 14 et 43%, par rapport à des moyennes de 25-35% et de 40-45% respectivement.

Afin de comparer les résultats obtenus par le panel en FISH, le SNP a été effectué sur des tumeurs dont les résultats ont été obtenus au préalable en FISH. Cependant, en retournant aux échantillons congelés afin de prendre le matériel génétique nécessaire pour effectuer le SNP, 4 tumeurs n'avaient plus assez de matériel. Le cas échéant, les résultats du SNP ont été obtenus pour les 12 autres tumeurs (tableau VII). Selon les résultats obtenus par le SNP, quatre tumeurs (4/12, 33%), les numéros 9, 16, 18 et 19, n'ont aucune anomalie de structure et sont diploïdes. Les tumeurs 3 et 20 (2/12, 17%) ont seulement une augmentation de la ploïdie. Au contraire, quatre tumeurs (4/12, 33%), les numéros 1, 2, 10 et 15, ont des anomalies de structure, mais sont diploïdes. Finalement, une seule tumeur (14) présente à la fois une augmentation de la ploïdie et des anomalies de structure.

Tableau VII Anomalies retrouvées en SNP pour *MYCN* ainsi que pour les régions chromosomiques sujettes à des anomalies de structure dans le neuroblastome pour les 12 tumeurs de la FISH

#	<i>MYCN</i>	1p	1q	2	11q	17p	17q	Conclusion suggérée	Cytométrie flux
1	na				del(11q14.1-qter)			Diploïde, del(11q)	Triploïde
2	na	del(1p36.22-32)			del(11q13.4-qter)		g(17q12-qter)	Diploïde, del(1p), del(11q), g(17q)	Diploïde
3	na	g(1p)	g(1q)	g(2)		g(17p)	g(17q)	Triploïde, del(11q)	---
7	na					g(17p12-17pter)	g(17q21.1)	Diploïde, g(17p), g(17q21.1)	Triploïde
9	na							Diploïde	Diploïde
10	a	g(1p12-1pter)					g(17q21.1)	Diploïde, g(1p), amp(<i>MYCN</i>), g(17q)	Triploïde
14	na	g(1p)	g(1q)	g(2)	g(11q)	g(17p)	g(17q) x2	Triploïde, g(17q)	Triploïde
15	na			g(2)	del(11q23.3)	g(17p12-cent)	g(17q21.1-21.2)	Diploïde, +2, del(11q), g(17p), g(17q)	Triploïde
16	na							Diploïde	---
18	na							Diploïde	Diploïde
19	na							Diploïde	---
20	na	g(1p)	g(1q)	g(2)		g(17p12-cent)	g(17q21.2)	Triploïde, del(11q)	---

Des anomalies du chromosome 1 ont été retrouvées dans 4 tumeurs. Le chromosome 2, sans prendre en compte l'état de *MYCN*, avait des anomalies dans 3 tumeurs. La délétion 11q était présente dans 3 tumeurs, alors que des anomalies du chromosome 17 étaient présentes dans 6 tumeurs. del = délétion, g = gain, amp = amplification, cent=centromères, --- = données non disponibles. Entre parenthèses = région de l'anomalie.

6. COMPARAISON DES RÉSULTATS DE LA FISH ET DU SNP

Afin de faciliter la comparaison, les conclusions suggérées des deux techniques ont été rassemblées (tableau VIII). Seulement cinq tumeurs (numéros 14, 16, 18, 19 et 20) ont des conclusions suggérées identiques pour la FISH et le SNP. Cinq tumeurs ont des différences par rapport à la ploïdie. Deux d'entre elles (tumeurs 7 et 9) sont détectées comme triploïdes au FISH et diploïdes au SNP, alors que les trois autres (1, 10, 15) sont détectées para-tétraploïdes en FISH et diploïdes au SNP. Quatre tumeurs ont des différences d'anomalies de nombre et/ou de structure. Dans la moitié de ces tumeurs, des anomalies apparaissent à la FISH et ne sont pas présentes au SNP (numéros 3, et 9), alors que dans les deux autres tumeurs, des anomalies sont présentes en SNP, mais pas à la FISH (tumeurs 2 et 7). Finalement, des anomalies du même chromosome, mais différentes entre la FISH et le SNP sont retrouvées dans trois tumeurs (numéros 1, 10 et 15).

Afin d'optimiser la comparaison des techniques, les résultats de la cytométrie de flux faits par le laboratoire de biochimie du CHU Ste-Justine seront utilisés comme technique de référence. Sur les 12 tumeurs, seulement huit ont été faits en cytométrie de flux.

Tableau VIII Comparaison des conclusions suggérées par la FISH et le SNP

#	FISH	SNP	Cytométrie flux
1	Para-tétraploïde, del(1p), del(11q)x3, +17	Diploïde, del(11q)	Triploïde
2	Diploïde, del(11q), g(17q)	Diploïde, del(1p), del(11q), g(17q)	Diploïde
3	Triploïde, del(11q), +17	Triploïde, del(11q)	nd
7	Triploïde	Diploïde, g(17p), g(17q21.1)	Triploïde
9	Triploïde, -1, -17	Diploïde	Triploïde
10	Para-tétraploïde, del(1p), amp(MYCN), del(11q), +i(17q)	Diploïde, g(1p), amp(MYCN), g(17q)	Triploïde
14	Triploïde, g(17q)	Triploïde, g(17q)	Triploïde
15	Para-tétraploïde, -1, g(2p), del(11q)x2	Diploïde, +2, del(11q), g(17p), g(17q)	Triploïde
16	Diploïde	Diploïde	nd
18	Diploïde	Diploïde	Diploïde
19	Diploïde	Diploïde	nd
20	Triploïde, del(11q)	Triploïde, del(11q)	nd

Conclusions suggérées pour un même échantillon par les techniques de la FISH et du SNP, comprenant la ploïdie et les anomalies de structure et de nombre. del = délétion, g = gain, amp = amplification, + = gain d'un chromosome complet, - = perte d'un chromosome complet, nd = non disponible.

7. SNP – ANOMALIES DU 14Q DANS LE NEUROBLASTOME

La technique SNP a également été utilisée pour vérifier la présence d'anomalies du bras long du chromosome 14 dans le neuroblastome. L'analyse du bras 14q a révélé des zones de perte d'hétérozygotie à copie neutre, de délétion et de gain. Sur les 36 tumeurs, 10 n'avaient aucune anomalie en 14q, 9 avaient uniquement des anomalies de structure, 11 avaient uniquement des CN-LOH et 5 présentaient à la fois des anomalies de structure et des CN-LOH (tableau IX).

Ainsi, seize tumeurs présentaient des pertes d'hétérozygotie à copie neutre. Parmi ces 16 tumeurs, 4 avaient plus d'une zone de CN-LOH sur le chromosome 14q (tumeurs 6, 10, 35 et 37, tableau IX), totalisant 23 zones de CN-LOH sur 16 chromosomes. Sur ces 23 LOH, 11 étaient situées sur la bande 14q23.3, 10 touchaient des sous-bandes localisées dans la région 14q21.1-q23.2 (parmi lesquelles 4 en 14q21.3, 3 en 14q23.1) (figure 18, A), 1 était en 14q24.2 et une en 14q31.1-q31.3 (non illustrées).

Au total, des anomalies de structure du chromosome 14q ont été retrouvées dans 15 tumeurs (15/36, 42%). De ces 15 tumeurs, 8 avaient des délétions (8/36, 22%) qui étaient présentes sous deux formes; soit des délétions complètes du bras long (2/8 tumeurs), soit des délétions interstitielles (6/8 tumeurs) de longueur variable. Les délétions interstitielles ont été retrouvées à plusieurs régions du bras 14q. Il a été possible de les séparer en deux régions, la première partant du centromère jusqu'en 14q24.3 et la seconde se situant de 14q32.11 jusqu'en q terminal (figure 19, B).

Également, 7 tumeurs sur 36 présentaient des gains (7/36, 19%), dont la longueur était comprise entre 107kb et 154kb. Ils ont tous été retrouvés au niveau de la bande 14q32.2 (figure 19, C).

Sur les 12 tumeurs analysées en SNP pour les anomalies fréquemment retrouvées dans le NB (tableau VII), 9 (tumeurs 2, 3, 7, 9, 10, 14, 15, 16 et 19) avaient des anomalies du chromosome 14 (tableau IX). Pour trois tumeurs (9, 16 et 19) présentant des anomalies du 14q (respectivement une CN-LOH, une délétion et une

CN-LOH et un gain et une CN-LOH), aucune autre anomalie n'avait été décelée sur les chromosomes d'intérêt. Quatre autres régions de délétion observées sur le 14q (tumeurs 2, 7, 14 et 15) sont toutefois retrouvées sur des tumeurs ayant un gain sur le 17q, particulièrement à la région 17q21.1. Cette anomalie du 17q semble cependant être présente dans d'autres tumeurs qui n'ont pas de délétion du 14q (tumeurs 10 et 20). Les CN-LOH ne semblent pas associées à une anomalie particulière, pouvant être retrouvées à des délétions 11q (tumeurs 2 et 15), à une délétion 1p (tumeur 2) ou encore à un gain du 1p (tumeur 10).

Tableau IX Anomalies du 14q retrouvées dans les 36 tumeurs analysées par SNP

No tumeur	Stade	Gain / délétion	CN-LOH
1	4	N	N
2	4	del (14q32.2-qter)	LOH (14q23.1)
3	2	N	LOH (14q23.3)
4	4	N	N
5	1	g (14q32.2)	N
6	4	N	LOH (14q22.2, q23.1 et q23.3)
7	2	del (14q22.1-22.2)	N
9	1	N	LOH (14q23.3)
10	3	N	LOH (14q22.3 et q23.3 et q24.2)
11	4	N	N
12	4	N	N
14	1	del (14q)	N
15	4S	del (14q)	LOH (14q23.3)
16	3	del (14q24.3)	LOH (14q23.3)
18	4	N	N
19	4	g (14q32.2)	LOH (14q22.1)
20	4S	N	N
22	3	g (14q32.2)	N
23	4	g (14q32.2)	N
24	4S	g (14q32.2)	N
25	3	g (14q32.2)	N
26	4	N	N
27	4	N	N
28	2	N	N
29	4	g (14q32.2)	N
30	3	N	LOH (14q23.3)
31	4	N	N
32	4	N	LOH (14q23.1)
33	1	del (14q21.1-q23.1 et de 14q32.11-q32.13)	N
34	1	N	LOH (14q23.3)
35	4	N	LOH (14q21.3 et q23.1 et q23.3)
36	2	N	LOH (14q23.3)
37	2	del (14q cent - q21.13)	LOH (14q21.1-21.3 et 14q31.1-q31.3)
38	4	N	LOH (14q23.2)
39	2	N	LOH (14q23.3)
40	2	del (14q cent - q24.3 et 14q32.11-q32.13)	N

Zones du bras chromosomique 14q ayant des anomalies de structure et des pertes d'hétérozygotie dans les 36 tumeurs faites au SNP, parmi lesquelles sont retrouvées huit délétions, sept gains et 16 CN-LOH. N = normal / sans anomalie 14q, g=gain, del= délétion.

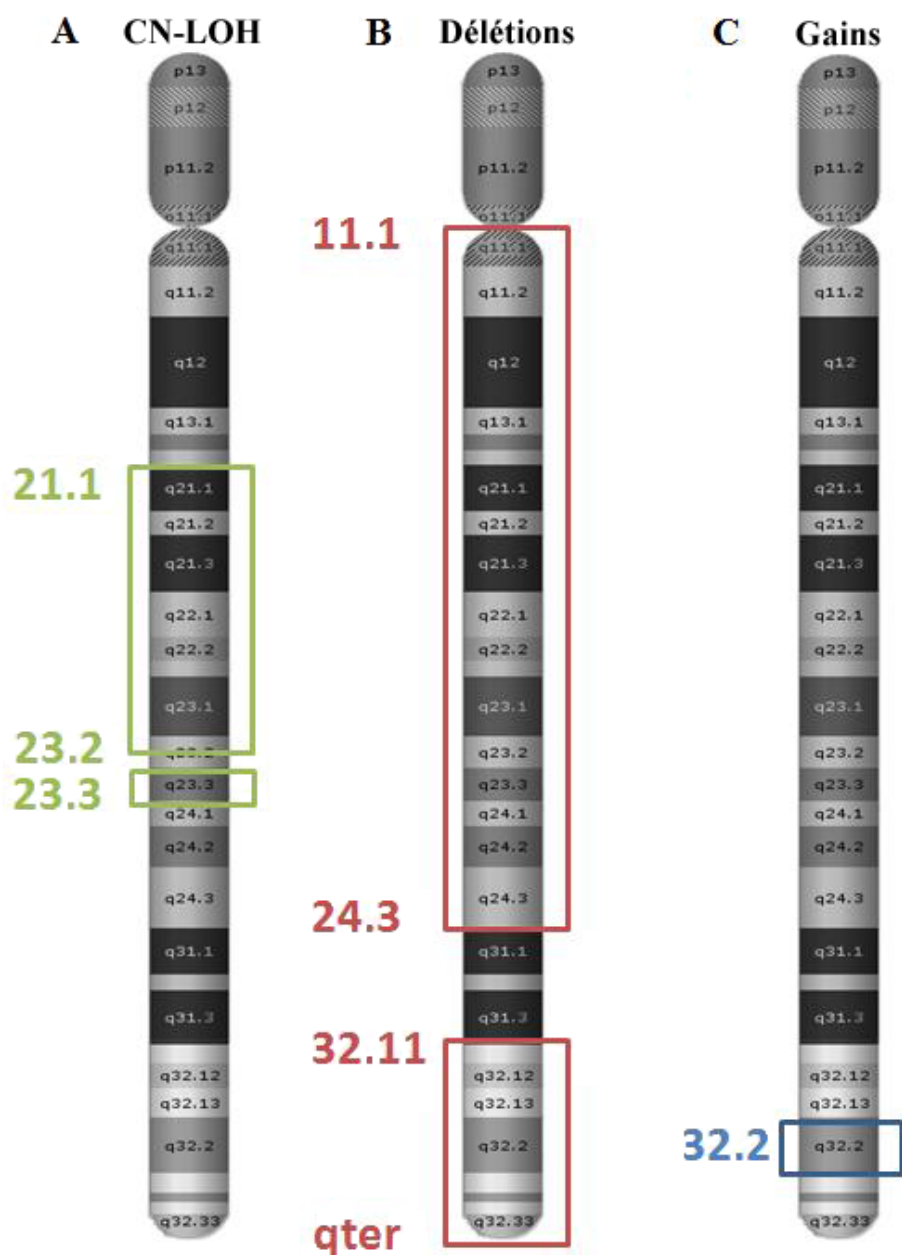


Figure 19. Régions chromosomiques touchées par les anomalies en 14q
 Différentes régions du bras long du chromosome 14 ont subies des anomalies dans notre échantillon de neuroblastome. Les CN-LOH se sont retrouvées en 14q21.1-23.2 et en 14q23.3 (A), les délétions interstitielles touchaient presque tout le 14q (B) et les gains se situaient sur la sous-bande 14q23.3 (C).

Vu les divers types d'anomalies trouvées, les résultats ont été analysés afin de vérifier s'ils étaient corrélés à des données cliniques : le stade de la tumeur et l'évolution des patients. En séparant les tumeurs de bas grade (stades 1 et 2, 12 au total) et les tumeurs de haut grade (stades 3 et 4, 21 au total), les gains se retrouvent davantage dans les tumeurs de haut grade (5/21, 23%) (figure 20, A), mais cette relation est non statistiquement significative. Au contraire, les délétions sont plus présentes dans les tumeurs de bas grade (5/12, 42%) et ce, de façon statistiquement significative ($p=0,03$) (figure 20, B). Les pertes d'hétérozygotie à copie neutre quant à elles ne semblent pas influencées par le grade de la tumeur (figure 20, C).

Par la suite, les tumeurs ont été séparées selon l'évolution des patients en date du dernier rendez-vous selon les informations disponibles en août 2010 : la survie (patients vivants) ou le décès (patients décédés). Contrairement à la division selon les grades, les gains du 14q ne semblent pas varier selon l'évolution du patient et se retrouvent en nombre similaires chez les patients vivants et décédés (figure 21, A). Les délétions et les CN-LOH semblent toutes deux être plus présentes chez les patients vivants (figure 21, B et C).

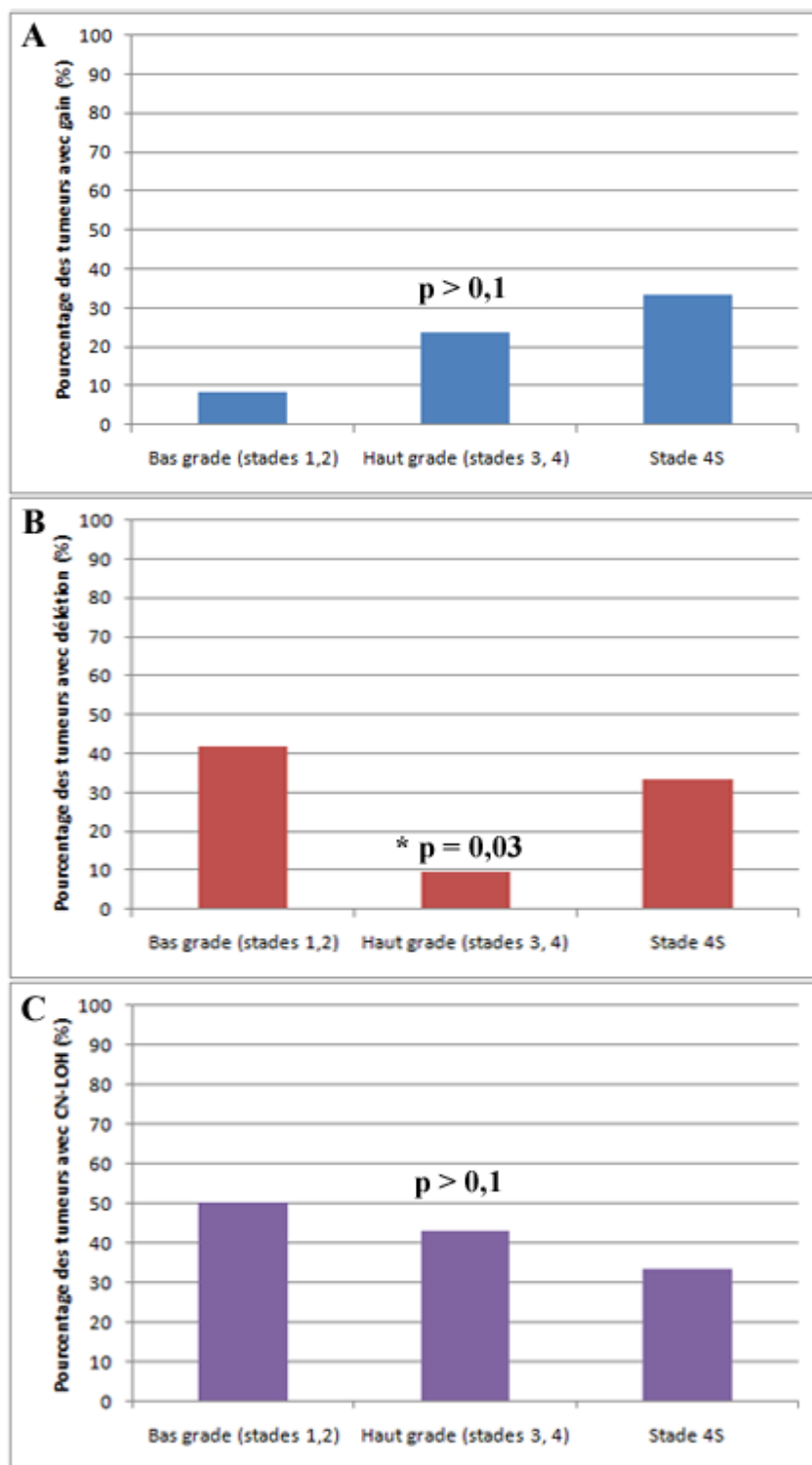


Figure 20. Anomalies du 14q selon le grade des tumeurs.

- A. NB avec des gains en 14q se retrouvent en plus grand pourcentage dans les tumeurs de haut grade
- B. NB avec des délétions en 14q se retrouvent en plus grand pourcentage dans les tumeurs de bas grade. La relation est statistiquement significative ($p < 0,05$)
- C. NB avec des CN-LOH en 14q semblent stables entre les tumeurs de bas et de haut grade

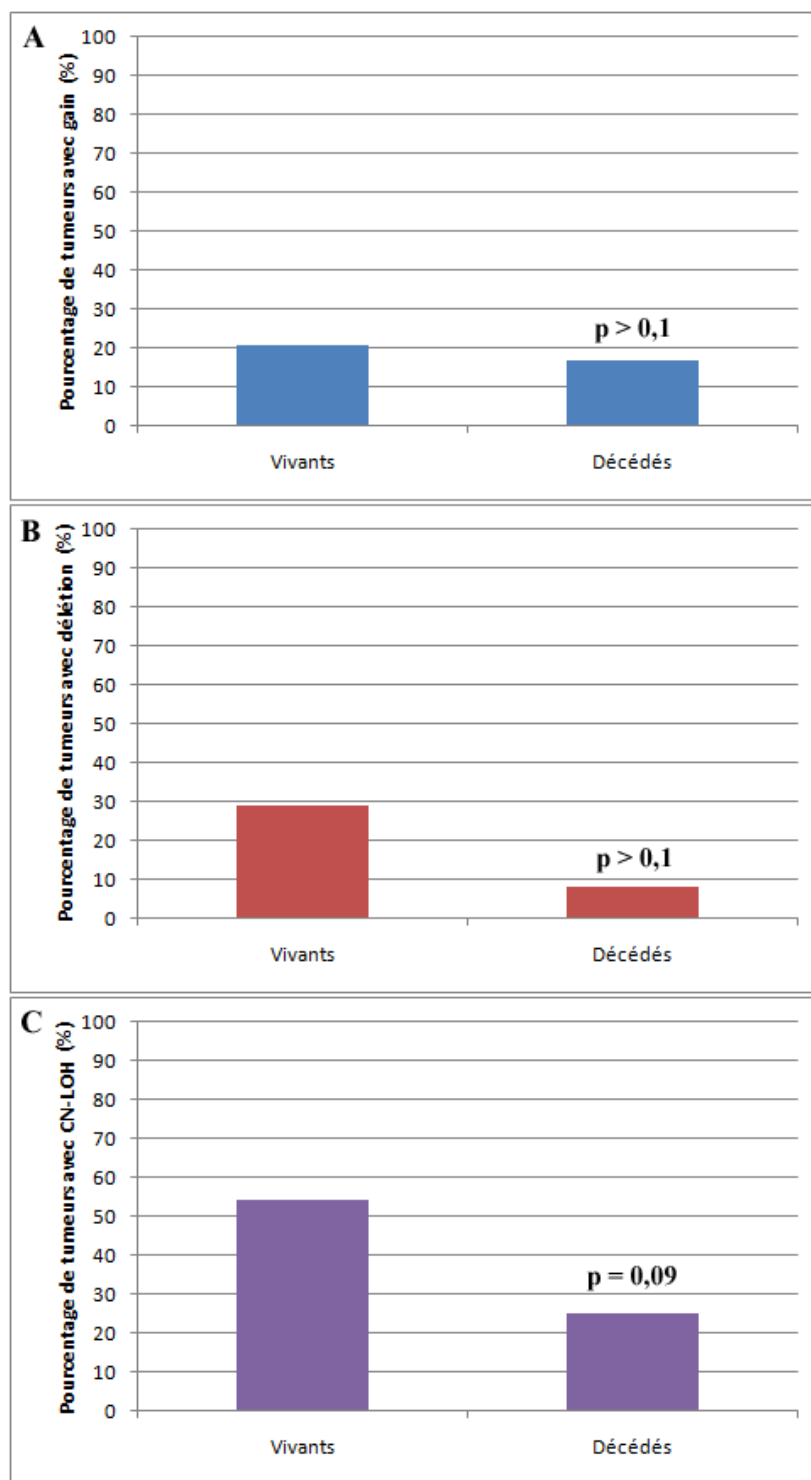


Figure 21. Anomalies du 14q selon l'évolution des patients.

- A. NB avec des gains en 14q ne semblent pas varier selon l'évolution du patient.
- B. NB avec des délétions en 14q se retrouvent en plus grand pourcentage chez les patients toujours vivants en 2010.
- C. NB avec des CN-LOH en 14q se retrouvent en plus grand pourcentage chez les patients toujours vivants en 2010.

Aucune de ces relations ne ressort au niveau de l'analyse statistique.

8. SNP - GÈNES ASSOCIÉS AUX ANOMALIES DU 14Q

Puisque certains types d'anomalies retrouvés sur le 14q se situent dans des régions communes, les gènes se situant dans ces régions ont été explorés. Six gains sur sept retrouvés dans la région 14q32.2 touchent le gène *BCL11B* (figure 22, A). *BCL11B* code pour une protéine en doigt de zinc et est essentiel au développement de la lignée des lymphocytes T et à la répression des gènes des cellules NK chez la souris [62].

Quant aux 16 tumeurs ayant des CN-LOH, 11 se retrouvent sur la bande 14q23.3. Il s'avère que 10 d'entre elles touchent le gène *GPHN* (figure 22, B), qui est essentiel pour la localisation des récepteurs inhibiteurs de la glycine au niveau de la membrane postsynaptique [57] et pour celle des récepteurs GABA(A) [33]. Une anomalie du gène *GPHN* a déjà été retrouvée dans le cancer. En effet, *GPHN* a été identifié comme partenaire de translocation de *MLL* dans les leucémies [30].

Finalement, puisque la protéine MAX interagit avec MYCN et que son gène est situé sur le 14q, la présence d'anomalies sur ce gène a été vérifiée. Sur les 36 tumeurs incluses dans le SNP, seulement 4 tumeurs ont des anomalies dans la région du gène *MAX*, comprenant 3 délétions et 1 CN-LOH (figure 22, C).

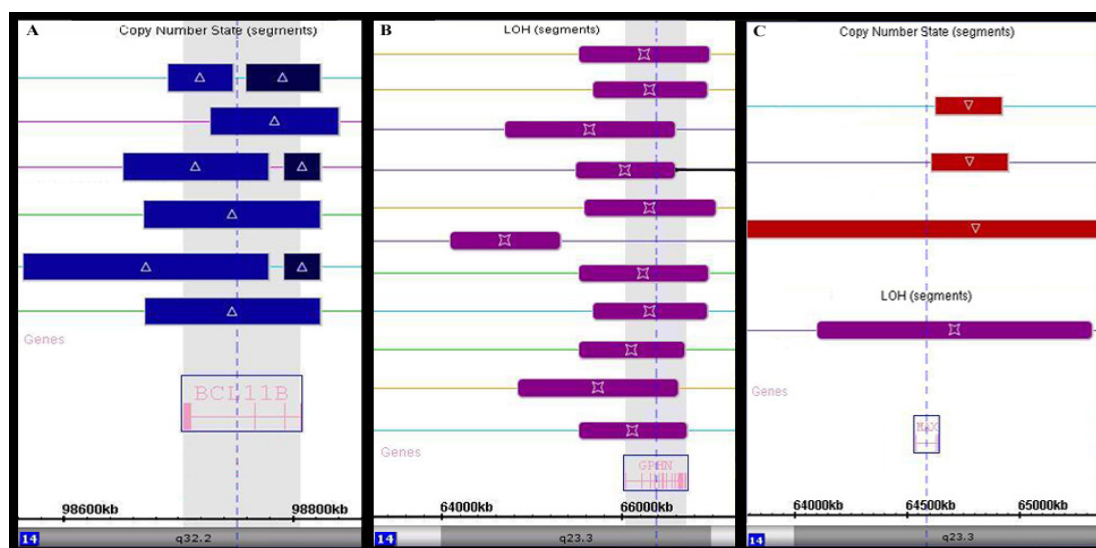


Figure 22. Variations observées autour des gènes d'intérêt du chromosome 14q
 Gènes retrouvés dans les régions de gains (A) et de CN-LOH (B) du chromosome 14q et anomalies retrouvées sur le gène *MAX* situé en 14q (C). Les zones grises en A et B représentent la région du gène.

Une association avec les données cliniques des patients a été recherchée pour chacun de ces gènes d'intérêt (tableau X). Pour les 11 tumeurs avec CN-LOH sur *GPHN*, elles se retrouvent en nombre égal dans les tumeurs de bas grade et de haut grade. Cependant, elles sont majoritairement retrouvées chez des patients âgés de plus de 12 mois sans amplification de *MYCN*.

Quant aux 6 tumeurs avec gain de *BCL11B*, elles se retrouvent en majorité (4) dans les tumeurs de haut grade. Toutefois, elles se retrouvent en nombre égal chez les plus ou moins de 12 mois et il manque trop de statut de *MYCN* (3/6) pour retirer une tendance.

Finalement, les anomalies de *MAX* semblent se retrouver plus dans les tumeurs de bas grade, chez des patients de plus de 12 mois sans amplification de *MYCN*.

Tableau X Nombre de tumeurs avec anomalies des gènes *GPHN*, *BCL11B* et *MAX* selon le stade, l'âge et le statut de *MYCN*

		<i>GPHN</i>	<i>BCL11B</i>	<i>MAX</i>
Stades	1	2	1	2
	2	3	0	0
	3	2	1	2 (LOH)
	4	3	3	0
	4S	1	1	0
Âge	< 12	2	3	1
	> 12	9	3	3 (LOH)
MYCN	na	8	3	3 (LOH)
	a	1	0	0
	ns	2	3	1

Étant donné que deux types d'anomalies (1 LOH et 3 délétions) se retrouvaient sur le gène *MAX*, la CN-LOH a été identifiée entre parenthèses. Pour les gènes *GPHN* et *MAX*, il y avait autant de tumeurs de bas grade (stades 1,2) que de tumeurs de haut grade (3,4), alors que le gène *BCL11B* semble avoir plus de tumeurs de haut grade. Les patients de 12 mois et plus avaient plus d'anomalies du gène *GPHN* et *MAX*, alors qu'il n'y avait aucune différence dans l'âge au diagnostic pour le gène *BCL11B*. Seulement une anomalie avec amplification de *MYCN* a été retrouvée avec une anomalie touchant à un gène (*GPHN*).

9. SNP – GÈNE *AKT*

Finalement, l'analyse du SNP a porté sur le gène *AKT*. Des anomalies d'*AKT* ont été retrouvées dans 17% des tumeurs (6/36). Plus précisément, un gain, une délétion et 4 CN-LOH touchent *AKT* (figure 23, tableau XI). Il est à noter qu'un gain et une délétion supplémentaires touchent *AKT*, mais ils sont inférieurs à 100kb (respectivement 32 et 49kb), alors ils n'ont pas été pris en considération dans les analyses.



Figure 23. Anomalies du gène *AKT* retrouvées dans 6 neuroblastomes

Une délétion (en rouge), un gain (en bleu) et 4 CN-LOH (en mauve) se recouvraient partiellement (dans 1 cas sur 6) ou complètement (dans 5 cas sur 6) le gène *AKT*.

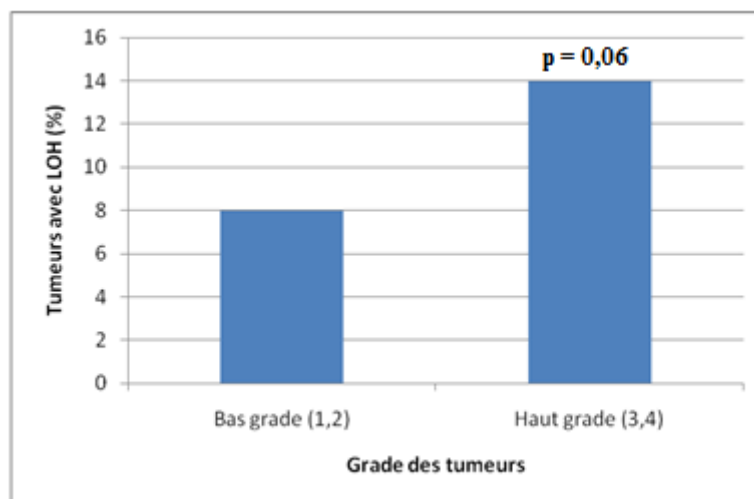
Le gain et la délétion retrouvées sur *AKT* se retrouvent tous deux dans les tumeurs de stade 4, chez des patients âgés au diagnostic de plus de 12 mois et sans amplification de *MYCN* (voir tableau XI). Les quatre CN-LOH se retrouvent quant à elles dans un neuroblastome de stade 2, un de stade 3 et deux de stade 4, parmi lesquelles trois des patients étaient âgés de plus de 12 mois au diagnostic et deux tumeurs n'ont pas d'amplification de *MYCN*, alors que les deux autres sont non spécifiées.

Tableau XI Anomalies touchant le gène *AKT*

Numéro tumeur	Anomalie	Stade INSS	Âge au diagnostic	<i>MYCN</i>	Taille (kb)
40	LOH	2	< 12	na	1206
10	LOH	3	> 12	ns	1714
2	LOH	4	> 12	na	2068
11	LOH	4	> 12	ns	1200
6	Gain	4	> 12	na	138
2	Délétion	4	> 12	na	1547

De toutes les anomalies retrouvées sur le gène *AKT*, une était de stade 2, une de stade 3 et quatre de stade 4. Une seule a été retrouvée chez des patients âgés de moins de 12 mois (celle de stade 2), alors que tous les autres patients avaient plus de 12 mois au diagnostic. Quatre tumeurs n'avaient pas d'amplification du gène *MYCN*, alors que l'information pour les deux autres n'était pas disponible. na = non amplifié, ns = non spécifié.

En séparant les tumeurs présentant des CN-LOH sur *AKT* selon le total des tumeurs de bas grade (stades 1 et 2, 12 au total) et de haut grade (stades 3 et 4, 21 au total) (figure 24), les CN-LOH semblent se retrouver préférentiellement dans les tumeurs de haut grade (3/21, 14%), mais la relation est statistiquement non significative ($p=0,6$).

**Figure 24. Perte d'hétérozygotie du gène *AKT* selon le grade des tumeurs**

Séparation des tumeurs de bas grade et de haut grade présentant des CN-LOH sur le gène *AKT*. Les pertes d'hétérozygotie semblent se retrouver davantage dans les tumeurs de haut grade.

DISCUSSION

Le neuroblastome est reconnu pour sa grande hétérogénéité caractérisée par ses différents comportements cliniques, allant de la régression spontanée à la progression mettant la vie en danger [123]. Le NB est une tumeur solide servant de modèle dans lequel l'analyse génétique fournit des informations primordiales guidant la prise en charge optimale du patient [10]. En effet, le traitement du NB est stratifié selon les groupes de risque, basés non seulement sur le stade INSS, l'âge du patient et l'histologie, mais également sur les facteurs génétiques. Certaines de ces anomalies génétiques sont des facteurs pronostics puissants et sont devenues des composants essentiels pour la caractérisation de la tumeur. Même si les groupes de risque sont relativement prédictifs du comportement clinique de la tumeur, des échecs de traitement surviennent encore dans tous les sous-types de patients [10]. La découverte de marqueurs pronostiques additionnels pour améliorer la sous-division des neuroblastomes, et par conséquent le traitement des patients, est donc un défi important en oncologie pédiatrique [91].

1. Données cliniques

La sélection des tumeurs s'est basée sur des critères pratiques, tel la quantité de tumeur utilisable, et analytiques, tel la disponibilité des différentes informations cliniques. Cette sélection a entraîné, malgré le grand nombre de tumeurs en banque au CHU Ste-Justine, que peu d'entre elles ont pu être utilisées. Nonobstant cette restriction, notre échantillon a conservé une bonne représentativité des populations tumorales habituellement retrouvées dans la littérature et a ainsi conservé tout son potentiel d'analyse.

2. Zones d’empreinte sur lames

Les empreintes de tissus congelés se sont avérées plus difficiles à réaliser que celles de tissus frais pour deux raisons principales. La première est liée directement aux échantillons et peut expliquer les lames n’affichant peu ou pas assez de noyau sur les lames. Ces cas d’échec sont attribués à différents facteurs tels un prélèvement pauvre en cellules tumorales, un stroma schwannien abondant de nécrose et de calcifications.

La deuxième raison est liée à la technique. Les lignes texturées visualisées au microscope étaient certainement le résultat de la fixation de colle sur la lame. Depuis la fin des années 1990, le CHU Ste-Justine utilise une technique de congélation des échantillons nécessitant de la colle. Cette colle, bien que blanche lorsqu’elle est présente en bonne quantité, est transparente s’il n’en reste qu’une fine couche. Ainsi, malgré les tentatives d’enlever complètement la colle entourant les échantillons, il est possible qu’une mince couche non visible à l’œil nu demeurait sur l’échantillon. La présence résiduelle de colle peut s’expliquer par deux scénarios. Le premier étant simplement qu’il restait de la colle sur la tumeur lors de l’appui sur la lame. Ce faisant, ce n’était pas du matériel tumoral qui était transféré sur la lame, mais plutôt une couche de colle. Le second suppose plutôt que la colle ait été enlevée de la section de la tumeur touchant la lame, mais qu’il en restait au pourtour de l’échantillon. Pendant la manipulation de l’échantillon, il est possible que la colle se soit réchauffée rapidement et ait coulé sur l’échantillon de façon à recouvrir la zone touchant à la lame avant d’avoir pu terminer l’empreinte. Ainsi, soit il n’y avait que de la colle présente sur la lame, soit elle recouvrait complètement les noyaux, ce qui rendait impossible l’application de la technique de la FISH, puisque les sondes n’auraient pas pu atteindre les noyaux et hybrider avec l’ADN tumoral.

3. FISH - Établissement du panel

Le plus grand avantage du premier essai effectué était l'économie du temps de lecture, puisqu'il était composé d'une seule lame. Une lame contenant deux zones d'empreintes, un total de deux cents noyaux (cent noyaux par lame) étaient comptés par échantillon. Cet essai nous permettait d'évaluer toutes les anomalies de structure voulues adéquatement, mais seulement deux chromosomes (1, 2) informaient sur la ploïdie. En effet, utiliser un seul noyau entraînait qu'il fallait choisir entre diminuer le nombre de sondes utilisées ou rendre la lecture très difficile, voire impossible, dû à un trop grand nombre de sondes présentes dans un même noyau. Cet essai avait donc un désavantage majeur : restreindre le nombre de sondes pour ne pas surcharger la lecture. Il s'est rapidement avéré que les lames étaient difficiles à lire. Les multiples sondes de chaque lame se retrouvaient fréquemment à différents niveaux et il fallait varier la profondeur du champ à plusieurs reprises pour parvenir à compter toutes les sondes. Puisque les sondes n'étaient pas visualisées sur un seul plan, le risque d'erreur dans le décompte des sondes était plus grand.

Par ailleurs, les signaux jaunes comme ceux de la sonde MLL sont créés par la juxtaposition d'une sonde émettant de la fluorescence verte et d'une sonde émettant une fluorescence orange. Lorsque cette juxtaposition n'est pas parfaite, il est possible d'observer un signal vert, un signal orange et un signal jaune au centre. Le centre jaune indique la zone de juxtaposition entre les deux sondes, mais les signaux vert et orange indiquent une juxtaposition incomplète. Puisque d'autres sondes émettant une fluorescence verte et orange étaient également présentes sur l'empreinte 1, lorsque les deux sondes contenues dans la sonde MLL ne sont pas bien juxtaposées ou advenant une anomalie créant la séparation des deux sondes, le signal de la sonde MLL n'apparaît plus uniquement jaune, mais avec du vert et du orange. Alors, il faut déterminer si les signaux proviennent de deux chromosomes différents qui sont près l'un de l'autre puisque une couleur peut correspondre à deux sondes différentes, ou si c'est effectivement la sonde MLL qui s'est séparée ou mal juxtaposée. Il a donc été jugé préférable de laisser la sonde MLL seule sur une empreinte ou avec une sonde d'une couleur autre qu'orange ou verte.

Les essais ultérieurs ont donc été faits sur deux lames, permettant notamment d'ajouter des sondes afin d'améliorer l'évaluation de la ploïdie. La sonde Miller-Dieker a été ajoutée dans ce but lors du deuxième essai. Une sonde supplémentaire localisée en 17p aurait pu être ajoutée sur l'empreinte 3 pour donner un indice supplémentaire quant à la ploïdie. Toutefois, outre les couleurs orange, vert et jaune, les autres couleurs de sondes (telles aqua ou bleue) doivent être visualisées sous un autre filtre au microscope, ce qui entraîne une étape supplémentaire dans la lecture des lames. Il a donc été décidé qu'il était préférable de laisser la sonde MLL seule. Les empreintes 1, 3 et 4 se sont avérées satisfaisantes quant à la lecture des sondes et à l'information qu'elles apportaient. Toutefois, la sonde rouge Miller-Dieker était difficile à lire; il fallait régulièrement changer de filtre afin d'avoir une qualité maximale de l'image et le temps passé pour chaque noyau était sensiblement augmenté. Quoique le nombre de noyaux à analyser par échantillon doublait (maintenant à 400 par échantillon) par rapport au premier essai, le temps de lecture est demeuré acceptable, ce qui peut être expliqué par la diminution des ajustements devant être faits au microscope. Le troisième essai visait donc à remplacer la sonde Miller-Dieker. Toutefois, non seulement le filtre utilisé n'était pas le même pour les signaux bleus de la sonde CEP17, mais ils étaient également difficiles à voir et à prendre en photo. La troisième sonde utilisée pour le 17p, la sonde SMS, avec son signal bien visible a permis de compléter le panel, qui répondait aux critères fixés au départ : permettre l'analyse des facteurs génétiques importants dans le pronostic du NB, être facile à lire et ce, dans un minimum de temps.

Lors de l'extension du panel à plusieurs tumeurs, cinq tumeurs provenant d'échantillons congelés n'ont pas donné de résultat lisible, soit par manque ou absence de signaux ou par une intensité trop faible des signaux. Plusieurs raisons peuvent être évoquées pour expliquer un tel résultat. Les premières sont relatives à la technique, telles une dénaturation inadéquate du spécimen ou de la sonde (température trop basse), une sonde qui n'a pas été ajoutée ou encore une dilution inappropriée pour l'hybridation. Toutefois, plusieurs sondes étaient dénaturées simultanément et plusieurs avaient un signal adéquat, rejetant ainsi cette possibilité.

Puisque ce sont les mêmes dilutions qui ont été utilisées pour toutes les sondes et pour toutes les lames, il est également improbable que ce soit la raison de l'absence ou de la faible intensité des sondes sur ses spécimens. Ainsi, ce sont les raisons reliées à l'échantillon qui demeurent les plus probables, telles qu'une présence résiduelle de colle ou un échantillon trop épais empêchant l'hybridation sur les noyaux.

4. FISH - Résultats

Plusieurs marqueurs cytogénétiques décrits dans la littérature sont actuellement utilisés dans la division des NB en groupes de risque, alors que d'autres sont encore sous investigation quant à leur valeur pronostique. Plusieurs techniques permettent d'identifier ces anomalies génétiques classiques dans le NB. Ces techniques ayant toutes des avantages et des inconvénients, ainsi que des sensibilités et des spécificités différentes, il est à se demander lesquelles sont les plus exactes et les plus avantageuses pour l'utilisation clinique. De ce fait, malgré une démarche de standardisation internationale pour les critères pronostiques et des groupes de risque pour le NB, les techniques demeurent très variables entre les différents centres. Par exemple, le CHU Ste-Justine utilise la FISH pour quelques anomalies (*MYCN*, 1p36) et, de façon non systématique, la cytométrie de flux pour la ploïdie, alors que le COG utilise plutôt les microsatellites pour caractériser les anomalies fréquentes du NB.

Afin de vérifier la validité de la recherche des anomalies génétiques du NB par FISH, il fallait évaluer si cette technique permettait de rechercher tous les facteurs génétiques actuellement utilisés (ploïdie, amplification de *MYCN*, délétion 1p36, délétion 11q23 et gain 17q). Puisque tous les chromosomes ne sont pas visualisés par la FISH, évaluer le niveau de ploïdie par cette technique est une extrapolation à partir des chromosomes contre lesquels étaient dirigées les sondes. Dans un cas comme la tumeur 16 (tableau V) où la majorité des cellules ont deux copies de chaque bras chromosomique, la diploïdie de la tumeur est presque certaine. Cependant, la ploïdie peut être extrêmement difficile à évaluer à partir de la FISH uniquement. En effet, sur les 22 autosomes et la paire de chromosomes sexuels, les sondes évaluent uniquement

une petite région du chromosome. En outre, seuls quelques chromosomes sont visés par l'analyse, puisque cette technique est restreinte par le nombre de sondes avec fluorochromes inclus dans une même zone d'hybridation. Il est possible que ces quelques chromosomes ne représentent pas adéquatement la ploïdie, surtout qu'habituellement, les chromosomes visés par la FISH sont des zones d'intérêt d'anomalies pour la maladie en cause. Ainsi, lorsque presque toutes les régions auxquelles les sondes s'hybrident ont des anomalies, il devient difficile de dire quelle anomalie est une délétion ou un gain par rapport à une variation de la ploïdie. Ainsi, le but est de déterminer si les cellules sont anormales et, si oui, quelles anomalies sont présentes.

Prenons comme exemple la tumeur 15 (tableau V), pour laquelle les résultats de la FISH montrent trois copies des loci 1p36 et du 1q25, cinq copies du locus 2p24 et du CEP2, deux copies du locus 11q23 et quatre copies des loci 17p13 et 11q21. Si les anomalies sont prises séparément et comparées à une cellule diploïde sans anomalies, ces résultats pourraient être expliqués par un gain du chromosome 1, le gain de trois chromosomes 2 et le gain de deux chromosomes 17. Il faut toutefois prendre en considération que l'interprétation ne se fait pas dans le cadre d'une cellule diploïde normale, mais dans le cas d'un cancer pédiatrique. Également, il faut garder en tête que les cancers ont habituellement une multitude d'anomalies complexes. En outre, la délétion du bras long du chromosome 11 est fréquente dans le neuroblastome. Dans le cas présent, tous les autres chromosomes visés par la FISH sont en nombre augmentés. Ainsi, les résultats suggèrent plus probablement une délétion du chromosome 11 suivi d'une augmentation de la ploïdie, ce qui mène à une conclusion suggérée de para-tétraploïdie, dans laquelle certains chromosomes sont présents en quatre copies, mais pas tous.

Avec la fréquence de la variation du nombre de copies observées entre les différents chromosomes visés par l'analyse FISH dans notre échantillon, la ploïdie n'est pas évidente à déterminer. Il faut se baser sur les anomalies souvent rapportées dans le NB, telles que la délétion 11q et le gain 17q, mais la variation du nombre de copies

d'un chromosome dans le cancer est également fréquente, venant complexifier l'analyse. Dans le panel choisi, quatre chromosomes pouvaient nous informer sur la ploïdie possible de la tumeur. Toutefois, lorsque le gène *MYCN* est amplifié, il est difficile, voire impossible, de détecter le nombre exact de la sonde située sur le 2p tellement la sonde *MYCN* est présente en grande quantité. L'analyse de la ploïdie s'effectue alors sur trois chromosomes subissant souvent des anomalies. Il aurait peut-être été préférable d'ajouter au panel un autre chromosome n'étant pas souvent rapporté avec des anomalies dans le NB. Ainsi, lorsque la plupart des chromosomes d'intérêt avaient des anomalies, ce chromosome ajouté aurait pu mieux informer sur la ploïdie de la tumeur. Des études ont cependant proposé un lien entre le nombre de copies du chromosome 1 et la ploïdie de la tumeur [54, 104]. Pour les tumeurs du panel dont la ploïdie évaluée par la cytométrie de flux était disponible, seulement quatre montraient une concordance entre le nombre de copies du chromosome 1 et la ploïdie. Nos résultats ne démontrent donc pas une telle corrélation.

Afin de déterminer si la conclusion suggérée par le décompte des sondes reflète l'état réel de la tumeur, il est idéal de pouvoir comparer cette conclusion avec les résultats d'une technique de référence. Pour se faire, les résultats obtenus en cytométrie de flux par le laboratoire de biochimie du CHU Ste-Justine ont été cherchés pour les tumeurs du panel. Malheureusement, quatre des tumeurs du panel (3, 16, 19 et 20) n'ont pas été évaluées en cytométrie de flux. En comparant les conclusions suggérées pour la ploïdie par la FISH avec les résultats obtenus en cytométrie de flux pour les 12 tumeurs (tableau V), la majorité des ploïdies déterminées sont concordantes (7/12, 58%). Dans les cinq autres cas (tumeurs 1, 9, 10, 15 et 21), les résultats sont non concordants; dans tous les cas surévalués par la FISH. Ces tumeurs présentent toutes au moins deux chromosomes analysés présents en plus de deux copies. Le chromosome 11 est celui qui est le moins fréquemment augmenté, étant présent en 3 copies dans une seule tumeur (tumeur 9). Dans la tumeur 1, les chromosomes 1, 2 et 17 sont présents en plus de deux copies dans le clone principal, mais les pourcentages de cellules retrouvées ayant ces anomalies (voir appendices 5) sont respectivement de 38, 68 et 67%. Puisque trois chromosomes sur quatre sont en nombre augmentés, il

est plausible que le génome entier ait une ploïdie augmentée, mais il est également possible que ces anomalies soient des gains de chromosomes spécifiques, et non du génome entier, puisque les anomalies ne sont pas présentes dans 100% des cellules lues. Dans la tumeur 9, les chromosomes 2 et 11 sont présents en trois copies, alors que les chromosomes 1 et 17 sont en deux copies, mais les pourcentages de ces clones triploïdes et diploïdes ne sont jamais de 100%, variant plutôt entre 54 et 70%. Les résultats du deuxième clone principal démontrent que chaque chromosome est présent en deux ou en trois copies qui correspondent aux deux clones les plus fréquemment retrouvés pour tous les chromosomes. Ainsi, il est difficile d'établir correctement la ploïdie en étant basé uniquement sur cette technique, puisqu'il faudrait pouvoir établir si les autres chromosomes de la tumeur ont également cette distribution des anomalies. Dans la tumeur 10, deux chromosomes (1 et 17) ont des anomalies de nombre, mais accompagnées d'anomalie de structure. En effet, le clone principal du chromosome 1 présente deux copies du 1p et quatre copies du 1q et celui du 17 montre 4 copies du 17p et six copies du 17q. Ainsi, ce n'est pas uniquement un nombre plus grand de tout un chromosome, mais des délétions ou des gains de bras chromosomiques ou de régions chromosomiques. Pour le chromosome 1, au lieu d'être un gain de deux chromosomes 1, puis une délétion 1p, qui est une anomalie fréquemment retrouvée dans le neuroblastome, il est possible que ce soit plutôt le gain de deux 1q ou encore un isochromosome 1q qui soit présent dans la cellule. Il est également possible qu'un signal additionnel sur un bras chromosomique soit en fait un réarrangement interstitiel (ex : inversion) séparant la sonde en deux parties, et donc l'émission de deux signaux, ce qui est impossible à distinguer à la FISH et qui peut mener à une surestimation de la ploïdie. Pour la tumeur 15, les chromosomes 1, 2 et 17 sont présents en plus de deux copies, respectivement à 3 copies (53%), cinq copies (46%) et 4 copies (63%). Pour les chromosomes 1 et 17, le second clone retrouvé est diploïde à 29 et 24% respectivement. Puisque tous les chromosomes analysés semblent présents en nombre différent, il est ardu de déterminer le nombre de copies des chromosomes non analysés. Néanmoins, puisque la délétion de chromosomes est plus fréquente que le gain de chromosomes isolés, la ploïdie est le plus souvent vue à la hausse dans de tels cas, ici mise comme para-tétraploïde.

Cependant, la cytométrie de flux indique plutôt une triploïdie, ce qui implique le gain des chromosomes 2 et 17 au lieu d'une délétion des chromosomes 1 et 11. Finalement, les clones majoritaires de la tumeur 21 ont trois copies du chromosome 1 (58%), trois copies du chromosome 2 (74%) et quatre copies du 17 (48%), mais a deux copies du chromosome 11 (100%). Puisque la majorité des chromosomes observés ont un nombre de chromosomes augmenté, il était logique de déterminer une ploïdie augmentée. Toutefois, les deuxièmes clones les plus fréquemment retrouvés de ces chromosomes étaient tous diploïdes, ce qui pouvait laisser miroiter la possibilité que les autres chromosomes étaient également diploïdes, comme l'indique la cytométrie de flux.

Cette surestimation peut donc être expliquée par plusieurs facteurs. Ne regardant qu'un nombre limité de chromosomes, le nombre de signaux retrouvés sur chacun d'entre eux n'est pas nécessairement égal à celui des autres chromosomes de la cellule. Si deux ou trois chromosomes sur 4 semblent avoir un nombre élevé de copies, l'analyse suggère une ploïdie augmentée, ce qui n'est pas nécessairement le cas, puisqu'il est possible que tous les chromosomes non évalués par la FISH soient en fait présents en deux copies. D'autre part, la présence de plusieurs clones à l'intérieur d'une même cellule est possible, voire même fréquente dans le cancer, et peut entraîner une mauvaise interprétation si le clone principal a une ploïdie augmentée, mais est présent dans un faible pourcentage de cellules et que les autres clones sont diploïdes. Finalement, les anomalies fréquemment retrouvées dans un cancer sont évidemment à tenir en compte, mais il faut également se souvenir qu'elles ne sont pas présentes dans toutes les tumeurs et que les anomalies sont complexes dans les tumeurs malignes. Il semble donc que, même si la ploïdie est évaluée par extrapolation dans la technique de la FISH, la majorité des cas reflètent adéquatement la ploïdie de la tumeur. Il n'en demeure pas moins que l'interprétation de la FISH doit prendre en considération les anomalies génétiques fréquemment retrouvées dans le cancer évalué. Nonobstant ces résultats encourageants, la FISH devrait systématiquement être accompagnée d'une technique permettant d'évaluer plus directement la ploïdie de la tumeur, ce qui non seulement faciliterait l'analyse, mais

rendrait également les résultats plus fiables. Cette technique peut être la cytométrie de flux, qui a l'avantage d'être peu dispendieuse, mais nécessite une relativement grande quantité de matériel tumoral [7], ce qui n'est pas toujours disponible.

En ce qui à trait à détection de la présence d'anomalies de structure, la FISH est une technique de choix. En effet, elle permet de cibler les anomalies recherchées et est très fiable. Il est possible de déterminer les gènes touchés par cette anomalie, correspondant à ceux se retrouvant dans le territoire couvert par la sonde. Cependant, elle ne permet pas de connaître la taille de l'anomalie (délétion ou gain), ni les sites de cassure exacts. Elle permet également de détecter des anomalies importantes mais de petite taille qui peuvent être manquées par une évaluation en cytogénétique standard à cause du seuil de détection moins élevé.

5. SNP - Résultats

Les 36 tumeurs prises pour le SNP ont été sélectionnées par des critères techniques : la possibilité de faire toutes les étapes de la technique (voir le matériel et méthodes). En outre, puisque l'analyse porte entre autres sur les anomalies génétiques dans le neuroblastome et que ces anomalies ont été retrouvées plus ou moins fréquemment dans les différents stades, il est important que la population tumorale reflète correctement la représentation globale des NB afin qu'une anomalie ne soit pas sous-représentée ou surreprésentée. Malgré le fait que les stades ne soient pas tous représentés en proportion égale, la population présentée ici est concordante avec ce qui est habituellement retrouvé dans la littérature [4, 44], ce qui assure que nos résultats sont interprétables et représentatifs.

Le logiciel ChAS utilisé pour l'analyse des données était visuellement et fonctionnellement adapté à nos besoins : il fournissait une vue générale du génome et il était facile de sélectionner une zone d'intérêt et fournissait facilement les régions de gains, amplifications, délétions et CN-LOH, selon les seuils fournis (100 kb). De plus, il permettait la vérification de la qualité des échantillons, l'obtention des données numériques reliées aux anomalies et identifiait les gènes et les variants situés

dans la région des anomalies sélectionnées. Cependant, la version utilisée montrait la variation du nombre de copies selon les anomalies détectées et n'était pas uniformisée. Au lieu de noter une trisomie pour le chromosome complet, le logiciel notait des gains de petites tailles qui s'enchaînaient partout sur le chromosome, ce qui rappelle que cette technique emploie un grand nombre de petites sondes qui s'hybrident un peu partout sur le génome, mais qui ne le couvrent pas complètement.

À première vue, il est évident que le SNP fournit des données très précises, donnant la longueur et la localisation exactes des anomalies. Puisqu'il permet une analyse globale du génome, il peut être utilisé comme outil de dépistage pour trouver de nouvelles anomalies possiblement impliquées dans le diagnostic et/ou le pronostic ce, même si elles sont de petites tailles. Cependant, le cancer étant associé à de multiples anomalies, réellement analyser tout le génome en n'ayant aucune idée des anomalies recherchées prendra énormément de temps, surtout si la limite fixée est à 100kb.

En ce qui à trait aux anomalies fréquemment retrouvées dans le neuroblastome, les pourcentages de chacune d'entre elles sont globalement concordants avec la fréquence relative habituellement décrite dans la littérature, permettant de confirmer la représentativité de notre population par rapport aux tumeurs neuroblastiques généralement retrouvées en clinique. Cependant, les pourcentages du gain 17q et de la délétion 1p sont un peu en deçà des pourcentages décrits. Peu d'études portant sur le SNP dans l'étude du NB ont été publiées et la majorité d'entre elles portent sur la recherche de nouvelles anomalies non décrites auparavant ou ciblent plutôt une sous-population de neuroblastomes (comme le neuroblastomes de haut risque) au lieu de comparer des techniques ou vérifier les résultats du SNP avec d'autres techniques. Ainsi, peu d'entre elles font état des anomalies fréquemment associées au NB. Parmi celles qui le font, les pourcentages retrouvés varient par rapport à ce qui est décrit dans la littérature, montrant une surreprésentation de la délétion 11q [72] et du gain 17q [39, 118], alors que la délétion 1p est parfois sous-représentée [72], parfois dans les limites des pourcentages décrits [39] ou encore surreprésentée [118]. Une étude a d'ailleurs comparé les résultats du SNP de 9 tumeurs et des 9 lignées cellulaires

dérivées de ces tumeurs et a conclu que la présence de stroma contribue à la sous-représentation des LOH et des variations du nombre de copies [118]. Il est évident que nos échantillons pouvaient contenir divers degrés de stroma schwannien ayant pu entraîner les pourcentages d'anomalies légèrement inférieurs à la littérature. Cette contamination peut également expliquer, du moins en partie, la grande variation retrouvée entre les études du neuroblastome par le SNP. D'autre part, malgré quelques régions minimales décrites dans la littérature pour les anomalies du NB, il demeure une grande variabilité dans la taille des gains et des pertes. En outre, aucun gène, excepté *MYCN*, n'a été identifié comme facteur pronostic dans ces anomalies. Ainsi, d'un point de vue clinique, il est à se demander quelle longueur d'anomalie doit être considérée comme facteur pronostic et lesquelles sont non informatives, d'une part pour assurer une bonne classification et d'autre part, pour diminuer le temps d'analyse.

En comparant les résultats de la ploïdie du SNP avec ceux de la cytométrie de flux, seulement 4 tumeurs sur 8 (50%) sont identiques, les quatre autres étant sous-évalués par le SNP. En effet, les tumeurs 1, 7, 10 et 15 sont ressortis triploïdes en cytométrie de flux alors que le SNP n'avait détecté que deux copies. Il faut se rappeler que le SNP évalue le nombre de copie par une différence d'intensité émise par les fluorochromes des sondes hybridées entre la moyenne de l'intensité des sondes situées à un même locus et l'intensité globale des puces sur tout le génome. Ainsi, le nombre de copies est un ratio basé sur l'évaluation de l'intensité individuelle des puces normalisé par différents algorithmes. Si tous les allèles sont dédoublés sur un même chromosome, le SNP peut détecter un gain de matériel, mais sera incapable d'en évaluer le nombre, il détectera une augmentation de l'intensité de la fluorescence. Cependant, les fluctuations dans l'intensité des signaux lumineux par rapport à la normale n'est pas une mesure précise et est sujet à variation selon plusieurs facteurs. Ces facteurs peuvent être reliés à la matrice. En effet, il a été prouvé que la position de la puce sur la matrice avait un impact sur l'intensité de fluorescence émise [121]. Par exemple, si les puces d'un locus sont situées dans la moitié supérieure de la matrice, l'intensité lue lors du processing est plus faible, ce

qui peut mener à une sous-estimation du nombre de copies. Cette divergence d'intensité par rapport à sa position de la matrice pourrait être due au mode de production et/ou à la composition de la matrice ou encore à la lumière (comment elle balaie la matrice, sa position par rapport à la matrice). Il est également possible que des hybridations non spécifiques (bruit de fond) aient une intensité aussi élevée qu'une hybridation spécifique. Advenant un tel bruit de fond, la variation entre la puce et la moyenne d'intensité serait diminuée lors du scan de l'image et du processing des données par l'ordinateur, ce qui mènerait à une sous-estimation de la ploïdie. D'autre part, il est possible qu'une puce se lie à une séquence de l'ADN d'intérêt autre que celle qui était visée au départ (hybridation croisée). Cette hybridation croisée est plus susceptible de se produire pour les SNP hétérozygotes (AB, par rapport aux homozygotes AA ou BB), dans lesquels les deux séquences ne varient que d'un nucléotide. Il est alors possible que les deux lient leur puce avec match parfait, mais il est également possible qu'une d'entre elle lie une séquence avec un seul nucléotide en complémentarité non parfaite (« mismatch »), ce qui fait diminuer l'intensité de la fluorescence des complémentarités parfaites et peut modifier la ploïdie. Une autre source d'hybridation croisée peut venir du fait que les puces avec match parfait sont créées pour être parfaitement complémentaires à une séquence cible, mais il n'est pas impossible qu'une autre séquence dans le génome partage une similarité à cette puce et s'y lie, surtout si une séquence d'ADN comprend plusieurs SNP. Il ne faut pas oublier que l'affinité de liaison des puces diffèrent selon la variabilité dans la séquence des puces, donc l'intensité de la fluorescence des puces pour une même séquence cible (ADN d'intérêt) est variable. Il a aussi été avancé que l'amplification du génome entier puisse entraîner des artéfacts dans la détermination du nombre de copies, puisque certaines régions d'ADN pourraient être amplifiées en plus grand nombre [121]. Cette amplification inégale pourrait entraîner une variation de l'intensité de la fluorescence entraînant une modification de la ploïdie. Ainsi, la normalisation de l'analyse du SNP par les différents logiciels va indiquer un chiffre pour la ploïdie suite au ratio de l'intensité de la puce sur l'intensité moyenne calculée, mais il existe plusieurs facteurs pouvant mener à une sous-estimation de la ploïdie, qui peuvent expliquer pourquoi 50% des

échantillons analysés sont ressortis diploïdes et non triploïdes. Ainsi, il serait préférable de vérifier les résultats du SNP pour la ploïdie par une technique standard, telle la cytométrie de flux.

La précision du SNP est par ailleurs beaucoup plus grande que celle de la FISH, permettant d'identifier les points de cassure précis des différentes anomalies. Elle permet également de déterminer si ce n'est qu'une partie du chromosome qui est impliqué, que ce soit une anomalie interstitielle ou terminale, ou si l'anomalie touche un bras chromosomique complet et de connaître la taille exacte de ses anomalies. Il est évident que les anomalies fréquentes du neuroblastome peuvent être évaluées grâce à cette technique précise et puissante, qui permet de détecter toute anomalie de structure déséquilibrée dans tout le génome. Plusieurs articles récents estiment que le SNP deviendra un outil inestimable pour une classification des cancers basée sur une caractérisation complète des changements génétiques somatiques qu'ils ont subis [19, 29]. S'il est vrai que cette technique est la plus puissante développée jusqu'à présent et qu'elle donne des informations précises sur une grande partie du génome, plusieurs failles restent encore à travailler (estimation de la ploïdie, élimination des contaminants, longueur des anomalies informatives) avant de pouvoir utiliser le SNP pour le diagnostic clinique. Pour l'instant, il n'est donc pas envisageable d'utiliser uniquement la technique du SNP pour établir le pronostic du NB et, comme la FISH, elle doit être accompagnée d'une autre technique pour évaluer la ploïdie de la tumeur et comparer les résultats.

6. Comparaison FISH - SNP

En regardant plus en détails, les résultats font ressortir des divergences entre les techniques de la FISH et du SNP (tableau VIII). Sur les 12 tumeurs comparées, seulement cinq tumeurs (numéros 14, 16, 18, 19 et 20) ont des résultats identiques (5/12, 42%). Les sept autres tumeurs ont des conclusions suggérées différentes. Ces divergences se retrouvent au niveau des anomalies de structure uniquement dans deux tumeurs (numéros 2 et 3, 2/12, 17%) et dans des anomalies de nombre et de structure dans cinq cas (numéros 1, 7, 9, 10 et 15, 5/12, 42%).

Les tumeurs ayant des résultats identiques n'ont pas ou peu d'anomalies. Trois d'entre elles sont uniquement diploïdes, sans aucune anomalie, alors que les deux autres sont triploïdes avec une anomalie de structure chacune. Les résultats plus complexes, présentant plusieurs anomalies, n'ont pas donnés de résultats similaires entre les deux techniques, montrant des niveaux de spécificité et de sensibilité différents.

En ce qui à trait aux divergences dans la ploïdie, les deux techniques comportent leur propre possibilité d'erreur tel que discuté précédemment; la FISH n'offre pas d'analyse globale du génome et l'on doit donc se fier aux régions chromosomiques ciblées, sujette à la surestimation de la ploïdie, alors que le SNP se base sur une hybridation différentielle de multiples sondes, plus sujet à la sous-estimation de la ploïdie, menant à une surreprésentation des tumeurs diploïdes. Pour les cinq tumeurs, la cytométrie de flux a détecté une triploïdie, alors que le SNP a détecté une diploïdie dans tous les cas et que la conclusion suggérée par la FISH donnait deux tumeurs triploïdes (numéros 7 et 9) et trois tumeurs para-tétraploïdes (numéros 1, 10 et 15) (discutées dans la section FISH - Résultats). Au final, la FISH seule a fourni une bonne conclusion dans 40% des cas, alors que le SNP n'a pu en détecter aucun, soutenant l'hypothèse de la sous-détection des tumeurs triploïdes ou tétraploïdes (raisons pouvant mener à cette sous-détection discutées dans la section SNP - Résultats). La FISH semble donc être une meilleure technique que le SNP pour

évaluer la ploïdie des tumeurs, quoiqu'elle ne soit pas parfaite et qu'il soit bon de la comparer avec une technique de référence.

En ce qui à trait aux divergences des anomalies de structure, deux types peuvent être distingués. D'une part, les anomalies détectées à la FISH et non au SNP et d'autre part, les anomalies détectées au SNP et non à la FISH. Étonnamment, c'est le premier cas qui survient le plus fréquemment. Étant donné la grande quantité d'information donnée par le SNP avec ses 1 851 826 sondes dans tout le génome, nous nous serions attendus à trouver plus d'anomalies au SNP, mais les résultats montrent le contraire.

Prenons le premier type, dans lequel des anomalies apparaissent au FISH et non au SNP. À deux reprises (tumeurs 1 et 3), la FISH détecte un gain complet du chromosome 17 qui n'est pas détecté au SNP. La première explication possible serait la présence d'un clone présent dans environ 20% des cellules que le SNP n'a pas été capable de distinguer lors de l'hybridation différentielle. Toutefois ce n'est pas le cas, puisque le gain a été vu dans respectivement 67 et 71% des cellules comptées à la FISH. Étant donné que la conclusion suggérée est un gain du chromosome complet, donc une anomalie qui est non déséquilibrée dans le sens où tout le matériel chromosomique du 17 est en plus, et non seulement une partie du 17, il est possible que la non détection du chromosome 17 supplémentaire découle de la même faiblesse à établir un ratio précis de l'intensité de la fluorescence des signaux pour la ploïdie. Ainsi, la moyenne de la fluorescence établie pour tout le génome ne différerait pas suffisamment de l'intensité de la fluorescence dégagée par les complémentarités parfaites du chromosome 17, ce qui crée un ratio normal ou près de la normale qui n'est pas détecté comme du gain de matériel par les logiciels de normalisation. Le cas de la tumeur 10 est différent, car le gain du 17q est détecté à la fois par la FISH et par le SNP, mais pas en nombre égal, c'est-à-dire que la FISH en a détecté 6 copies dans 73% des cellules, alors que le SNP n'en a détecté que 3 copies (cellules diploïdes +17q). Cependant, il n'y a pas six puces ayant une complémentarité parfaite avec l'ADN d'intérêt sur la matrice, ce qui limite la détection d'un aussi grand nombre de gain d'un bras chromosomique par le SNP. Quant à la tumeur 9, la FISH détecte une

perte des chromosomes 1 et 17, mais dans une optique de triploïdie, qui est d'ailleurs confirmée par la cytométrie de flux. Ainsi, la FISH détecte deux copies des chromosomes 1 et 17. Le SNP a également détecté deux copies des chromosomes 1 et 17, mais n'a pas détecté le gain équilibré des 19 autres autosomes.

Prenons maintenant le second type, dans lequel des anomalies ont été retrouvées en SNP, mais pas en FISH. Dans la tumeur 2, le SNP a détecté une délétion 1p qui n'apparaît pas au FISH. Plus précisément, la région de délétion se situe entre les sous-bandes 1p36.22-32, mais ne couvre pas totalement la sous-bande 1p36.32. La sonde Vysis LSI 1p36 se situe sur la bande 1p36, entre les loci RH75821 et SHGC57243, tous deux situés sur la bande 1p36.32. Il est alors possible de croire que la délétion détectée au SNP n'ait pas supprimé complètement la région d'hybridation de la sonde LSI 1p36, lui permettant de s'hybrider tout de même et de donner deux signaux, qui étaient présents dans 78% des cellules lors du décompte. L'autre tumeur présentant des anomalies détectées au SNP et non au FISH est la tumeur 7. Les deux anomalies sur ce chromosome sont un gain 17p12-1pter et un gain 17q21.1. Il faut d'abord noter que la sonde Vysis LSI SMS est située sur la sous-bande 17p11.2, qui est plus centromérique que le gain détecté au SNP, expliquant que cette anomalie ne soit pas apparue en FISH. Quant à la sonde Vysis LSI Rara, elle hybride sur la bande 17q21.1, qui est perçue en trois copies au SNP. Cependant, elle est également perçue en trois copies à la FISH, puisque la tumeur est triploïde selon la FISH, encore une fois confirmée par la cytométrie de flux, permettant de supposer que le SNP a, une fois de plus, sous-représenté le nombre de chromosome présent.

Les trois tumeurs présentant des anomalies différentes sur les mêmes chromosomes sont détectées para-tétraploïdes au FISH et diploïdes au SNP, alors qu'elles sont toutes triploïdes selon la cytométrie de flux. Toutes ses anomalies différentes découlent en fait de la mauvaise interprétation de la ploïdie par les deux techniques. Prenons l'exemple de la tumeur 10; si la FISH est para-tétraploïde, mais qu'elle détecte trois copies du chromosome 1p, alors la conclusion suggérée est une délétion du chromosome 1p. Pour la même tumeur, si le SNP est diploïde, alors trois copies du

chromosome 1p seront plutôt analysées comme un gain du chromosome 1p, alors qu'en fait les deux techniques montrent le même nombre de bras chromosomique 1p. Les autres anomalies résultent de la non détection du nombre de copies augmenté du chromosome par le SNP, menant à la conclusion d'une cellule diploïde, alors qu'en réalité elle est triploïde.

Ainsi, plusieurs des divergences observées à prime abord lors de la comparaison peuvent être expliquées de manière à unifier les résultats des deux techniques, rendant les résultats relativement concordants. Une autre étude avait comparé les techniques de la FISH et du SNP dans les syndromes myélodysplasiques et avait obtenu des résultats similaires entre les deux techniques [69]. D'autres études ont quant à elles comparé le SNP et la CGH et avaient obtenu une très bonne concordance entre les anomalies retrouvées [22]. Cependant, les deux techniques utilisent le même principe, se basant toutes les deux sur une hybridation différentielle, ce qui facilite la comparaison des résultats.

La détection des anomalies chromosomiques est d'une importance capitale dans le pronostic du neuroblastome. En clinique, les techniques utilisées actuellement pour la détection de ces anomalies sont la FISH et la CGH. La nécessité d'une détection sensible, précise et rigoureuse des anomalies chromosomiques est évidente et gagne en importance à chaque fois qu'un nouveau facteur génétique est inclus dans la stratification selon les groupes de risque.

Depuis quelques années, la technique du SNP devient de plus en plus précise et augmente sa résolution en augmentant le nombre de sondes qu'il est possible d'hybrider en une seule manipulation. Malgré cette avancée technologique, le SNP demeure à l'heure actuelle une technique à visée de recherche uniquement selon nos résultats. En effet, le coût élevé de cette technique ne vaut pas les résultats mitigés qu'elle peut amener pour les échantillons concernant la ploïdie ou les anomalies de nombre. D'autre part, elle apporte une quantité incroyable d'informations à analyser qui ne sont pas encore pertinentes pour la clinique et qui entraînent des questions

éthiques, puisqu'un seuil dans la taille des anomalies à tenir informatives n'a pas été fixé dans la littérature et que la découverte fortuite d'une anomalie entraînant des conséquences sur la santé est possible. Le cas échéant, doit-on le divulguer au patient même si ce n'était pas pour cette anomalie que l'investigation a été demandée? Et si l'on décide d'analyser qu'une partie ciblée du génome, mais qu'une telle anomalie est présente et n'est pas détectée, est-ce considéré comme de la négligence? Ces questions éthiques sont de plus en plus soulevées avec l'arrivée de techniques d'analyse globale du génome. Alors que la haute résolution est un des avantages majeurs du SNP, son manque de sensibilité est critique, un débalancement entre la résolution et la sensibilité ayant également été observé dans l'analyse des syndromes myélodysplasiques [69]. De plus, il ressort de cette analyse que les régions communes de délétion ou de gain décrites dans la littérature sont assez représentatives de la génétique du neuroblastome, puisque peu d'anomalies ont été détectées au SNP et non à la FISH et que les sondes utilisées ici se situaient à l'intérieur de ces régions.

Malgré que l'analyse globale du génome ait été proposée comme méthode pronostique la plus efficace [19, 29, 51], il n'existe pas encore assez de données probantes sur les différentes anomalies du neuroblastome pour qu'une analyse aussi globale soit nécessaire. En outre, certaines techniques combinées, mais moins coûteuses, peuvent apporter l'information actuellement requise sur les facteurs pronostiques permettant la classification des neuroblastomes en groupes de risque. Nonobstant cette réticence par rapport à la clinique, le SNP peut s'avérer utile en recherche afin d'analyser le génome entier d'un grand nombre d'échantillons à une grande sensibilité. Toutefois, il est évident que si, grâce à la recherche par des techniques d'analyse globale du génome tel le SNP, plusieurs autres facteurs génétiques sont découverts et deviennent des facteurs pronostics du neuroblastome, l'utilisation une technique d'analyse globale sera à évaluée, puisqu'une technique telle que la FISH demande beaucoup plus d'effort considérant qu'une sonde vise une seule anomalie.

7. SNP – Anomalies du 14q

La grande hétérogénéité des NB rend leur classification compliquée. Bien que plusieurs systèmes aient été proposés, aucun n'a encore réussi à unifier complètement ces différents phénotypes et génotypes. En effet, il reste encore des échecs de traitement dans tous les sous-groupes de NB et la recherche foisonnante dans ce domaine découvre de plus en plus d'anomalies génétiques dans le but d'améliorer la stratification. Cependant, peu de ces anomalies ont été reliées à une variable clinique leur conférant un pouvoir pronostic. La seule anomalie génétique ayant une influence directe sur la clinique est l'amplification du gène *MYCN*, qui confère un mauvais pronostic. De ce fait, un des défis majeurs dans l'analyse génétique du NB est l'identification d'anomalies génétiques particulières aux tumeurs de stade 3 et 4 qui n'ont ni amplification du gène *MYCN* ni délétion 1p [116].

Quelques études se sont penchées sur la perte d'hétérozygotie du chromosome 14q dans le NB. Cette LOH 14q31.1-32.2 au locus D14S1, surtout liée aux tumeurs de stade avancé, a été délaissée pendant plusieurs années, mais réapparaît comme anomalie dans les analyses globales du génome [28, 39, 72, 118]. D'autre part, le COG est actuellement en train d'évaluer son importance pronostique dans le NB. Nos résultats sont, à notre connaissance, les premiers à se pencher spécifiquement sur ce chromosome avec une technique aussi puissante que le SNP. Des CN-LOH ont été retrouvées dans 44% des tumeurs (16/36), ce qui est supérieur à ce qui a été rapporté dans la littérature par d'autres techniques (23-30%) [48, 106, 111]. De plus, sur les seize tumeurs avec CN-LOH, une seule se situait dans la région 14q31.1-32.2. Ce sont davantage les délétions retrouvées dans nos tumeurs qui sont concordantes avec les résultats de LOH rapportés précédemment. En effet, 22% des tumeurs (8/36) comportaient des délétions, parmi lesquelles trois tumeurs (numéros 2, 33 et 40) touchent spécifiquement les sous-bandes 14q31.1-32.2, alors que deux autres sont des délétions 14q complètes. Il faut cependant noter que le terme LOH est souvent utilisé dans la littérature comme un synonyme de délétion. Toutefois, une région commune de délétion n'est pas ressortie de nos résultats; les zones et les longueurs de délétions étant très variables d'une tumeur à l'autre. De façon intéressante, 17% des tumeurs

(6/36) avaient un gain de la bande 14q32.2, qui n'est pas une zone connue de variants. Selon nos connaissances, ce type d'anomalies n'a jamais été décrit dans la littérature pour le neuroblastome.

Il a été rapporté dans la littérature que certaines anomalies du NB survenaient de façon concomitante avec d'autres anomalies, telles l'amplification de *MYCN* et la délétion 1p [4, 7] ou encore le gain 17q et la délétion 1p [60]. De toutes les anomalies retrouvées en 14q, seules les délétions semblent survenir simultanément avec d'autres anomalies du NB : les gains 17q. Toutefois, le gain 17q est une anomalie très fréquente, survenant dans plus de la moitié des NB [8] et est habituellement associé à plusieurs autres anomalies de structure [116]. Ainsi, il faudrait analyser un plus grand nombre de tumeurs afin de vérifier si cette tendance est significative ou si elle est due au hasard.

Afin de voir si les anomalies du 14q sont corrélées avec des facteurs cliniques, elles ont d'abord été comparées au grade des tumeurs (figure 20). Les graphiques montrent une tendance d'association du gain 14q32.2 et des tumeurs de haut grade, mais le lien est statistiquement non significatif. Toutefois, les délétions 14q23-32 se retrouvent en plus grand nombre dans des tumeurs de bas grade et ce lien est statistiquement significatif, ce qui pourrait sous-tendre la présence d'un gène suppresseur de tumeur au niveau du 14q. Par la suite, les tumeurs ont été comparées à l'évolution des patients. Toutefois, malgré une tendance des délétions et des CN-LOH à se retrouver en plus grand nombre chez les patients toujours vivants, aucune des anomalies n'a de lien statistiquement significatif. Il faut cependant garder en tête que le nombre d'échantillons évalués ici est relativement petit et que ces corrélations devraient être confirmées et/ou infirmées sur un échantillon plus large. En effet, malgré un nombre de NB analysés respectable, une fois les tumeurs divisées selon les critères de haut grade/bas grade ou survie/décès et anomalies présentes/absentes, le nombre dans chacun des sous-groupes était assez petit. Il faudrait donc élargir le nombre de tumeurs afin de pouvoir évaluer plus précisément les différentes tendances observées.

8. SNP - Gènes associés aux anomalies du 14q

La technique SNP a l'avantage de permettre l'identification des variations du nombre de copies d'ADN et des LOH simultanément à haute résolution et ce, sur tout le génome en une seule technique. Ainsi, elle offre une plate-forme puissante pour la découverte d'oncogènes et de GST.

Le gène *GPHN* code pour la protéine gephyrine, qui est associée aux microtubules s'occupant de l'interaction des récepteurs glycine et GABA_A et avec le cytosquelette [55]. Selon une étude de Khodosevich [55], le GABA pourrait inhiber la migration des neuroblastes. D'autre part, la protéine PI3K, qui active AKT dans la voie PI3K/AKT, a été démontrée comme critique pour la migration des interneurons GABA pendant le développement embryonnaire [95]. Il a également été publié que la gephyrine interagissait avec mTOR, une des molécules cibles d'AKT [96]. Des CN-LOH touchant *GPHN* ont été trouvées dans 10 tumeurs sur 36. Ces anomalies ne semblent pas corrélées avec le stade de la tumeur, mais sont retrouvées en plus grand nombre chez les patients âgés de plus de 12 mois. *GPHN* est peu cité dans la littérature, mais quelques anomalies reliées à des maladies y ont été associées. Par exemple, la mutation de *GPHN* a été retrouvée dans des conditions neurologiques telle que l'hyperekplexie [27], un trouble moteur complexe caractérisé par une hypertonie néonatale, une exagération du réflexe de Moro et des crises non épileptiques. La gephyrine a été retrouvée dans des tissus non-neuronaux chez l'humain (foie, poumon, rein, glandes surrénales) [82]. *GPHN* a aussi été associé au chromosome 11 dans la leucémie par la t(11;14)(q23;q24) avec le gène *MLL*, ce qui est particulièrement intéressant puisque le 11q est fréquemment un site de délétion dans le neuroblastome et a un potentiel pronostic. Pour toutes ces raisons, *GPHN* pourrait avoir un impact dans le NB et il serait intéressant de pousser plus loin l'investigation sur ce gène.

Le gène *BCL11B* (B-cell lymphoma/leukaemia 11B) est relié au gène *BCL11A* dont la translocation est associée avec les lymphomes des cellules B. *BCL11B* n'a pas de fonction identifiée à ce jour chez l'humain, mais a un rôle critique dans le

développement du système immunitaire [119], dans le développement des motoneurones cortico-spinaux [2] et dans l'établissement de l'architecture cellulaire du striatum chez la souris [3]. Ce gène semble donc avoir plusieurs rôles non seulement dans l'immunité, mais dans le SN. Nous avons retrouvé un gain du gène *BCL11B* dans 86% des tumeurs (6 sur 7) ayant un gain de la sous-bande 14q32.2, laissant miroiter la possibilité que ce gène soit un oncogène et qu'une augmentation de son fonctionnement mène à un avantage sélectif pour les cellules tumorales. Contrairement aux anomalies de *GPHN*, les gains situées sur *BCL11B* se retrouvent en nombre égal chez les patients âgés de moins de 12 mois et de plus de 12 mois, mais se retrouvent en plus grand nombre dans les tumeurs de grade avancé (stades 3, 4). Un lien entre le gain de *BCL11B* et le développement ou l'évolution du NB reste à démontrer, mais une étude avec un plus grand nombre d'échantillons pourrait confirmer ou infirmer ce lien.

Finalement, puisque *MYCN* est un gène très important dans le pronostic du NB et que l'interaction de la protéine *MYCN* avec *MAX* est nécessaire pour son action (voir section 3.1.2.1), il était intéressant de vérifier si les anomalies du chromosome 14q affectaient le gène *MAX*, situé en 14q23. Seulement quatre tumeurs avec de telles anomalies (trois délétions et une CN-LOH) ont été retrouvées. Il ne semble pas y avoir de différences par rapport aux données cliniques entre les délétions et la perte d'hétérozygotie à copie neutre retrouvées sur *MAX* (tableau X). Il faut par ailleurs prendre en considération que, sur les quatre anomalies retrouvées dans cette région, il n'est pas possible d'affirmer que les trois délétions affectent directement et spécifiquement le gène *MAX*, puisque deux d'entre elles semblent ne toucher qu'une petite partie du gène, alors que la dernière est une délétion complète du 14q. Il faudrait vérifier si l'expression de *MAX* est modifiée par les deux premières délétions.

Prenons pour acquis que les quatre anomalies retrouvées affectent le gène *MAX*. Puisque l'association entre *MYCN* et *MAX* entraîne une activation des gènes promoteurs de la croissance cellulaire, il aurait été logique de retrouver une anomalie

entraînant une augmentation de la présence de la protéine MAX ou de son potentiel de liaison avec MYCN, comme par exemple un gain ou une amplification. Cependant, les anomalies retrouvées sur le gène *MAX* sont trois délétions et une CN-LOH, habituellement associées à une perte de fonction. Une explication possible est que MAX, en absence de MYCN, réprime la transcription. Puisque trois des tumeurs comprenant des anomalies de MAX n'ont pas d'amplification du gène *MYCN* (la quatrième tumeur étant non spécifiée pour cette anomalie) et donc une expression protéique de MYCN probablement normale, la présence de MAX seul réprimerait la transcription et donc la croissance cellulaire, ce qui va à l'encontre des caractéristiques des cellules tumorales, qui sont en division continue.

9. SNP – Gène *AKT*

Étant membre d'une voie reconnue importante dans la survie cellulaire, la protéine AKT a notamment comme fonction d'inhiber l'apoptose. Il est donc logique de croire qu'une cellule cancéreuse prendra avantage à conserver cette fonction afin de survivre. De plus, il a été démontré que l'activation d'AKT est un facteur de mauvais pronostic dans le NB [86]. Ainsi, le gain retrouvé sur *AKT* est facilement compréhensible dans le contexte du NB. Cependant, les anomalies les plus retrouvées sur *AKT* dans nos échantillons sont les CN-LOH, qui sont en général associés à une perte de fonction, puisqu'un allèle est perdu. Il serait toutefois intéressant de vérifier si l'expression de la protéine AKT a été modifiée dans les tumeurs présentant des CN-LOH du gène. Qui plus est, les CN-LOH semblent être associées aux tumeurs de haut grade, mais la relation est statistiquement non significative, ce qui est facilement explicable par le petit nombre de tumeurs avec des anomalies d'*AKT*.

CONCLUSIONS

Nous avons fait une analyse génétique de 36 neuroblastomes par hybridation *in situ* en fluorescence et par analyse des SNP.

La FISH, grâce au panel établi, s'est avérée être une bonne technique pour l'analyse complète des anomalies génétiques classiques du neuroblastome, en autant qu'elle soit accompagnée d'une autre technique permettant de confirmer la ploïdie. Avec l'avantage majeur de fournir une analyse globale du génome en une seule technique, l'analyse par le SNP, quoique similaire à l'analyse par la FISH en ce qui à trait aux anomalies déséquilibrées, s'est avérée moins sensible à l'évaluation de la ploïdie.

Les anomalies retrouvées sur le bras chromosomique 14q sont intéressantes par leur localisation et les gènes possiblement affectés, mais ne démontrent pour la plupart qu'une tendance à être associée avec des facteurs cliniques tels que le grade et l'évolution. Les anomalies du 14q ne semblent pas, dans la majorité des cas, associées aux anomalies du gène *AKT*.

Considérant l'importance des anomalies génétiques fréquemment retrouvées dans le neuroblastome en ce qui concerne le pronostic et les plans de traitement des patients, nos travaux soulignent l'importance de la vérification des résultats par une combinaison de technique et confirment, pour la première fois avec une technique aussi puissante que le SNP, que les anomalies du 14q pourraient être un facteur pronostic et/ou contenir un gène suppresseur de tumeur.

Cependant, notre étude ne comporte qu'un petit nombre de tumeurs et il est d'un intérêt évident à poursuivre ces travaux en élargissant le nombre de tumeurs. D'autre part, il serait intéressant de vérifier si les anomalies du 14q sont liées à une variation de l'expression des gènes *GPHN*, *BCL11B*, *MAX* et *AKT*.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abbott M. Abbott Molecular FISH, 2010 [online]. Illinois USA Abbott Laboratories, (August 18, 2010). Available at: http://www.abbottmolecular.com/FISH_11358.aspx.
2. Arlotta P, BJ Molyneaux, J Chen, J Inoue, R Kominami and JD Macklis (2005). "Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo." *Neuron*, 45(2): 207-221.
3. Arlotta P, BJ Molyneaux, D Jabaudon, Y Yoshida and JD Macklis (2008). "Ctip2 controls the differentiation of medium spiny neurons and the establishment of the cellular architecture of the striatum." *The Journal of neuroscience*, 28(3): 622-632.
4. Attiyeh EF, WB London, YP Mosse, Q Wang, C Winter, D Khazi, PW McGrady, RC Seeger, AT Look, H Shimada, GM Brodeur, SL Cohn, KK Matthay and JM Maris (2005). "Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma." *New England Journal of Medicine*, 353(21): 2243-2253.
5. Barbashina V, P Salazar, EC Holland, MK Rosenblum and M Ladanyi (2005). "Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene." *Clinical Cancer Research*, 11(3): 1119-1128.
6. Betts DR, N Cohen, KE Leibundgut, T Kuhne, U Caflisch, J Greiner, L Traktenbrot and FK Niggli (2005). "Characterization of karyotypic events and evolution in neuroblastoma." *Pediatric blood & cancer*, 44(2): 147-157.
7. Bown N (2001). "Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects." *Journal of Clinical Pathology*, 54(12): 897-910.
8. Bown N, S Cotterill, M Lastowska, S O'Neill, AD Pearson, D Plantaz, M Meddeb, G Danglot, C Brinkschmidt, H Christiansen, G Laureys, F Speleman, J Nicholson, A Bernheim, DR Betts, J Vandesompele and N Van Roy (1999). "Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma." *New England Journal of Medicine*, 340(25): 1954-1961.
9. Breslow N and B McCann (1971). "Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma." *Cancer Research*, 31(12): 2098-2103.
10. Brodeur GM (2003). "Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma." *Nature reviews. Cancer*, 3(3): 203-216.
11. Brodeur GM (2010). "Getting into the AKT." *Journal of the National Cancer Institute*, 102(11): 747-749.

12. Brodeur GM, AA Green, FA Hayes, KJ Williams, DL Williams and AA Tsiatis (1981). "Cytogenetic features of human neuroblastomas and cell lines." *Cancer Research*, 41(11 Pt 1): 4678-4686.
13. Brodeur GM, J Pritchard, F Berthold, NL Carlsen, V Castel, RP Castelberry, B De Bernardi, AE Evans, M Favrot, F Hedborg and et al. (1993). "Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment." *Journal of Clinical Oncology*, 11(8): 1466-1477.
14. Brodeur GM, RC Seeger, M Schwab, HE Varmus and JM Bishop (1984). "Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage." *Science*, 224(4653): 1121-1124.
15. Brodeur GM, G Sekhon and MN Goldstein (1977). "Chromosomal aberrations in human neuroblastomas." *Cancer*, 40(5): 2256-2263.
16. Capasso M, M Devoto, C Hou, S Asgharzadeh, JT Glessner, EF Attiyeh, YP Mosse, C Kim, SJ Diskin, KA Cole, K Bosse, M Diamond, M Laudenslager, C Winter, JP Bradfield, RH Scott, J Jagannathan, M Garris, C McConville, WB London, RC Seeger, SF Grant, H Li, N Rahman, E Rappaport, H Hakonarson and JM Maris (2009). "Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma." *Nature genetics*, 41(6): 718-723.
17. Capasso M and SJ Diskin (2010). "Genetics and genomics of neuroblastoma." *Cancer Treatment and research*, 155: 65-84.
18. Caren H, J Erichsen, L Olsson, C Enerback, RM Sjoberg, J Abrahamsson, P Kogner and T Martinsson (2008). "High-resolution array copy number analyses for detection of deletion, gain, amplification and copy-neutral LOH in primary neuroblastoma tumors: four cases of homozygous deletions of the CDKN2A gene." *BMC Genomics*, 9: 353.
19. Caren H, H Kryh, M Nethander, RM Sjoberg, C Trager, S Nilsson, J Abrahamsson, P Kogner and T Martinsson (2010). "High-risk neuroblastoma tumors with 11q-deletion display a poor prognostic, chromosome instability phenotype with later onset." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9): 4323-4328.
20. Caron H, P van Sluis, J de Kraker, J Bokkerink, M Egeler, G Laureys, R Slater, A Westerveld, PA Voute and R Versteeg (1996). "Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma." *New England Journal of Medicine*, 334(4): 225-230.
21. Caron H, P van Sluis, N van Roy, J de Kraker, F Speleman, PA Voute, A Westerveld, R Slater and R Versteeg (1994). "Recurrent 1;17 translocations in human neuroblastoma reveal nonhomologous mitotic recombination during the S/G2 phase

as a novel mechanism for loss of heterozygosity." *American Journal of Human Genetics*, 55(2): 341-347.

22. Carr J, NP Bown, MC Case, AG Hall, J Lunec and DA Tweddle (2007). "High-resolution analysis of allelic imbalance in neuroblastoma cell lines by single nucleotide polymorphism arrays." *Cancer genetics and cytogenetics*, 172(2): 127-138.

23. Chen M, Y Ye, H Yang, P Tamboli, S Matin, NM Tannir, CG Wood, J Gu and X Wu (2009). "Genome-wide profiling of chromosomal alterations in renal cell carcinoma using high-density single nucleotide polymorphism arrays." *International journal of cancer*, 125(10): 2342-2348.

24. Christiansen H, J Schestag, NM Christiansen, KH Grzeschik and F Lampert (1992). "Clinical impact of chromosome 1 aberrations in neuroblastoma: a metaphase and interphase cytogenetic study." *Genes, chromosomes & cancer*, 5(2): 141-149.

25. Chughtai SA, T Genus, P Ramani, S Dyer, JE Powell, D McMullan, V Davison and CM McConville (2006). "Multilocus loss of heterozygosity allelotypes identify a genetic pathway associated with progression from low to high stage disease in neuroblastoma." *European Journal of Cancer*, 42(12): 1826-1834.

26. Cohn SL, AD Pearson, WB London, T Monclair, PF Ambros, GM Brodeur, A Faldum, B Hero, T Iehara, D Machin, V Mosseri, T Simon, A Garaventa, V Castel and KK Matthay (2009). "The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report." *Journal of Clinical Oncology*, 27(2): 289-297.

27. David-Watine B (2001). "The human gephyrin (GPHN) gene: structure, chromosome localization and expression in non-neuronal cells." *Gene*, 271(2): 239-245.

28. Diskin SJ, C Hou, JT Glessner, EF Attiyeh, M Laudenslager, K Bosse, K Cole, YP Mosse, A Wood, JE Lynch, K Pecor, M Diamond, C Winter, K Wang, C Kim, EA Geiger, PW McGrady, AI Blakemore, WB London, TH Shaikh, J Bradfield, SF Grant, H Li, M Devoto, ER Rappaport, H Hakonarson and JM Maris (2009). "Copy number variation at 1q21.1 associated with neuroblastoma." *Nature*, 459(7249): 987-991.

29. Dutt A and R Beroukhi (2007). "Single nucleotide polymorphism array analysis of cancer." *Current opinion in oncology*, 19(1): 43-49.

30. Eguchi M, M Eguchi-Ishimae, M Seto, K Morishita, K Suzuki, R Ueda, K Ueda, N Kamada and M Greaves (2001). "GPHN, a novel partner gene fused to MLL in a leukemia with t(11;14)(q23;q24)." *Genes, chromosomes & cancer*, 32(3): 212-221.

31. Ellison LF, P De, LS Mery and PE Grundy (2009). "Canadian cancer statistics at a glance: cancer in children." *Canadian Medical Association Journal* 180(4): 422-424.
32. Emanuel BS and SC Saitta (2007). "From microscopes to microarrays: dissecting recurrent chromosomal rearrangements." *Nature reviews. Genetics*, 8(11): 869-883.
33. Essrich C, M Lorez, JA Benson, JM Fritschy and B Luscher (1998). "Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin." *Nature neuroscience*, 1(7): 563-571.
34. Evans AE, KD Kisselbach, X Liu, A Eggert, N Ikegaki, AM Camoratto, C Dionne and GM Brodeur (2001). "Effect of CEP-751 (KT-6587) on neuroblastoma xenografts expressing TrkB." *Medical and Pediatric Oncology*, 36(1): 181-184.
35. Fijneman RJ, B Carvalho, C Postma, S Mongera, VW van Hinsbergh and GA Meijer (2007). "Loss of 1p36, gain of 8q24, and loss of 9q34 are associated with stroma percentage of colorectal cancer." *Cancer Letters*, 258(2): 223-229.
36. Fong CT, PS White, K Peterson, C Sapienza, WK Cavenee, SE Kern, B Vogelstein, AB Cantor, AT Look and GM Brodeur (1992). "Loss of heterozygosity for chromosomes 1 or 14 defines subsets of advanced neuroblastomas." *Cancer Research*, 52(7): 1780-1785.
37. Freeman BB, 3rd, NC Daw, JR Geyer, WL Furman and CF Stewart (2006). "Evaluation of gefitinib for treatment of refractory solid tumors and central nervous system malignancies in pediatric patients." *Cancer Investigation*, 24(3): 310-317.
38. Gehring M, F Berthold, L Edler, M Schwab and LC Amler (1995). "The 1p deletion is not a reliable marker for the prognosis of patients with neuroblastoma." *Cancer Research*, 55(22): 5366-5369.
39. George RE, EF Attiyeh, S Li, LA Moreau, D Neuberg, C Li, EA Fox, M Meyerson, L Diller, P Fortina, AT Look and JM Maris (2007). "Genome-wide analysis of neuroblastomas using high-density single nucleotide polymorphism arrays." *PLoS One*, 2(2): e255.
40. George RE, R Kenyon, AG McGuckin, N Kohl, P Kogner, H Christiansen, AD Pearson and J Lunec (1997). "Analysis of candidate gene co-amplification with MYCN in neuroblastoma." *European Journal of Cancer*, 33(12): 2037-2042.
41. Geraci AP, J de Csepel, E Shlasko and SA Wallace (1998). "Ganglioneuroblastoma and ganglioneuroma in association with neurofibromatosis type I: report of three cases." *Journal of child neurology*, 13(7): 356-358.

42. Gilbert F, M Feder, G Balaban, D Brangman, DK Lurie, R Podolsky, V Rinaldt, N Vinikoor and J Weisband (1984). "Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17." *Cancer Research*, 44(11): 5444-5449.
43. Gladin CR, E Salsano, F Menghi, M Grisoli, F Ghielmetti, I Milanese, B Pollo, S Brock, A Cusin, L Minati, G Finocchiaro and MG Bruzzone (2007). "Loss of heterozygosity studies in extracranial metastatic meningiomas." *Journal of neuro-oncology*, 85(1): 81-85.
44. Guo C, PS White, MJ Weiss, MD Hogarty, PM Thompson, DO Stram, R Gerbing, KK Matthay, RC Seeger, GM Brodeur and JM Maris (1999). "Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas." *Oncogene*, 18(35): 4948-4957.
45. Gustafson WC and WA Weiss (2010). "Myc proteins as therapeutic targets." *Oncogene*, 29(9): 1249-1259.
46. Hayashi Y, N Kanda, T Inaba, R Hanada, N Nagahara, H Muchi and K Yamamoto (1989). "Cytogenetic findings and prognosis in neuroblastoma with emphasis on marker chromosome 1." *Cancer*, 63(1): 126-32.
47. Heck JE, B Ritz, RJ Hung, M Hashibe and P Boffetta (2009). "The epidemiology of neuroblastoma: a review." *Paediatric and perinatal epidemiology*, 23(2): 125-143.
48. Hoshi M, N Otagiri, HO Shiwaku, S Asakawa, N Shimizu, Y Kaneko, R Ohi, Y Hayashi and A Horii (2000). "Detailed deletion mapping of chromosome band 14q32 in human neuroblastoma defines a 1.1-Mb region of common allelic loss." *British Journal of Cancer*, 82(11): 1801-1807.
49. Janoueix-Lerosey I, D Penther, M Thioux, P de Cremoux, J Derre, P Ambros, P Vielh, J Benard, A Aurias and O Delattre (2000). "Molecular analysis of chromosome arm 17q gain in neuroblastoma." *Genes, chromosomes & cancer*, 28(3): 276-284.
50. Janoueix-Lerosey I, G Schleiermacher and O Delattre (2010). "Molecular pathogenesis of peripheral neuroblastic tumors." *Oncogene*, 29(11): 1566-1579.
51. Janoueix-Lerosey I, G Schleiermacher, E Michels, V Mosseri, A Ribeiro, D Lequin, J Vermeulen, J Couturier, M Peuchmaur, A Valent, D Plantaz, H Rubie, D Valteau-Couanet, C Thomas, V Combaret, R Rousseau, A Eggert, J Michon, F Speleman and O Delattre (2009). "Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma." *Journal of Clinical Oncology*, 27(7): 1026-1033.
52. Johansson B, T Fioretos and F Mitelman (2002). "Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia." *Acta haematologica*, 107(2): 76-94.

53. Kaneko Y, N Kanda, N Maseki, M Sakurai, Y Tsuchida, T Takeda, I Okabe and M Sakurai (1987). "Different karyotypic patterns in early and advanced stage neuroblastomas." *Cancer Research*, 47(1): 311-318.
54. Kaneko Y and AG Knudson (2000). "Mechanism and relevance of ploidy in neuroblastoma." *Genes, chromosomes & cancer*, 29(2): 89-95.
55. Khodosevich K, PH Seeburg and H Monyer (2009). "Major signaling pathways in migrating neuroblasts." *Frontiers in molecular neuroscience*, 2: 7.
56. Kim S and A Misra (2007). "SNP genotyping: technologies and biomedical applications." *Annual Review of Biomedical Engineering*, 9: 289-320.
57. Kirsch J, I Wolters, A Triller and H Betz (1993). "Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons." *Nature*, 366(6457): 745-748.
58. Lastowska M, S Cotterill, N Bown, C Cullinane, S Variend, J Lunec, T Strachan, AD Pearson and MS Jackson (2002). "Breakpoint position on 17q identifies the most aggressive neuroblastoma tumors." *Genes, chromosomes & cancer*, 34(4): 428-436.
59. Lastowska M, E Nacheva, A McGuckin, A Curtis, C Grace, A Pearson and N Bown (1997). "Comparative genomic hybridization study of primary neuroblastoma tumors. ." *Genes, chromosomes & cancer*, 18(3): 162-169.
60. Lastowska M, P Roberts, AD Pearson, I Lewis, J Wolstenholme and N Bown (1997). "Promiscuous translocations of chromosome arm 17q in human neuroblastomas." *Genes, chromosomes & cancer*, 19(3): 143-149.
61. Lavarino C, NK Cheung, I Garcia, G Domenech, C de Torres, M Alaminos, J Rios, WL Gerald, B Kushner, M LaQuaglia and J Mora (2009). "Specific gene expression profiles and chromosomal abnormalities are associated with infant disseminated neuroblastoma." *BMC Cancer*, 9: 44.
62. Li L, M Leid and EV Rothenberg (2010). "An early T cell lineage commitment checkpoint dependent on the transcription factor Bcl11b." *Science*, 329(5987): 89-93.
63. Li Z, F Tan, DJ Liewehr, SM Steinberg and CJ Thiele (2010). "In vitro and in vivo inhibition of neuroblastoma tumor cell growth by AKT inhibitor perifosine." *Journal of the National Cancer Institute*, 102(11): 758-770.
64. London WB, RP Castleberry, KK Matthay, AT Look, RC Seeger, H Shimada, P Thorner, G Brodeur, JM Maris, CP Reynolds and SL Cohn (2005). "Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group." *Journal of Clinical Oncology*, 23(27): 6459-6465.

65. Lonergan GJ, CM Schwab, ES Suarez and CL Carlson (2002). "Neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and ganglioneuroma: radiologic-pathologic correlation." *Radiographics*, 22(4): 911-934.
66. Look AT, FA Hayes, JJ Shuster, EC Douglass, RP Castleberry, LC Bowman, EI Smith and GM Brodeur (1991). "Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study." *Journal of Clinical Oncology*, 9(4): 581-591.
67. Lu X, A Pearson and J Lunec (2003). "The MYCN oncoprotein as a drug development target." *Cancer Letters*, 197(1-2): 125-130.
68. Maintz D, K Fiedler, J Koopmann, B Rollbrocker, S Nechev, D Lenartz, AP Stangl, DN Louis, J Schramm, OD Wiestler and A von Deimling (1997). "Molecular genetic evidence for subtypes of oligoastrocytomas." *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 56(10): 1098-1104.
69. Makishima H, M Rataul, LP Gondek, J Huh, JR Cook, KS Theil, MA Sekeres, E Kuczkowski, C O'Keefe and JP Maciejewski (2010). "FISH and SNP-A karyotyping in myelodysplastic syndromes: improving cytogenetic detection of del(5q), monosomy 7, del(7q), trisomy 8 and del(20q)." *Leukemia Research*, 34(4): 447-453.
70. Maris JM (2010). "Recent advances in neuroblastoma." *New England Journal of Medicine*, 362(23): 2202-2211.
71. Maris JM, C Guo, PS White, MD Hogarty, PM Thompson, DO Stram, R Gerbing, KK Matthay, RC Seeger and GM Brodeur (2001). "Allelic deletion at chromosome bands 11q14-23 is common in neuroblastoma." *Medical and Pediatric Oncology*, 36(1): 24-27.
72. Maris JM, G Hii, CA Gelfand, S Varde, PS White, E Rappaport, S Surrey and P Fortina (2005). "Region-specific detection of neuroblastoma loss of heterozygosity at multiple loci simultaneously using a SNP-based tag-array platform." *Genome Research*, 15(8): 1168-1176.
73. Maris JM, MD Hogarty, R Bagatell and SL Cohn (2007). "Neuroblastoma." *Lancet*, 369(9579): 2106-2120.
74. Maris JM and KK Matthay (1999). "Molecular biology of neuroblastoma." *Journal of Clinical Oncology*, 17(7): 2264-2279.
75. Maris JM, YP Mosse, JP Bradfield, C Hou, S Monni, RH Scott, S Asgharzadeh, EF Attiyeh, SJ Diskin, M Laudenslager, C Winter, KA Cole, JT Glessner, C Kim, EC Frackelton, T Casalunovo, AW Eckert, M Capasso, EF Rappaport, C McConville, WB London, RC Seeger, N Rahman, M Devoto, SF Grant, H Li and H Hakonarson (2008). "Chromosome 6p22 locus associated with clinically aggressive neuroblastoma." *New England Journal of Medicine*, 358(24): 2585-2593.

76. Maris JM, MJ Weiss, C Guo, RB Gerbing, DO Stram, PS White, MD Hogarty, EP Sulman, PM Thompson, JN Lukens, KK Matthay, RC Seeger and GM Brodeur (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." *Journal of Clinical Oncology*, 18(9): 1888-1899.
77. Maris JM, PS White, CP Beltinger, EP Sulman, RP Castleberry, JJ Shuster, AT Look and GM Brodeur (1995). "Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma." *Cancer Research*, 55(20): 4664-4669.
78. Marshall T and JC Rutledge (2000). "Flow cytometry DNA applications in pediatric tumor pathology." *Pediatric and developmental pathology* 3(4): 314-334.
79. Meddeb M, G Danglot, I Chudoba, AM Venuat, J Benard, H Avet-Loiseau, B Vasseur, D Le Paslier, MJ Terrier-Lacombe, O Hartmann and A Bernheim (1996). "Additional copies of a 25 Mb chromosomal region originating from 17q23.1-17qter are present in 90% of high-grade neuroblastomas." *Genes, chromosomes & cancer*, 17(3): 156-165.
80. Monclair T, GM Brodeur, PF Ambros, HJ Brisse, G Cecchetto, K Holmes, M Kaneko, WB London, KK Matthay, JG Nuchtern, D von Schweinitz, T Simon, SL Cohn and AD Pearson (2009). "The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report." *Journal of Clinical Oncology*, 27(2): 298-303.
81. Moore SW (2006). "The contribution of associated congenital anomalies in understanding Hirschsprung's disease." *Pediatric Surgery International*, 22(4): 305-315.
82. NCBI.Unigene, 2010 [online]. National Institutes of Health (August 18, 2010). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?UGID=163689&TAXID=9606&SEARCH=gephyrin>.
83. O'Keefe C, MA McDevitt and JP Maciejewski (2010). "Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies." *Blood*, 115(14): 2731-2739.
84. O'Neill S, L Ekstrom, M Lastowska, P Roberts, GM Brodeur, UR Kees, M Schwab and N Bown (2001). "MYCN amplification and 17q in neuroblastoma: evidence for structural association." *Genes, chromosomes & cancer*, 30(1): 87-90.
85. Okawa ER, T Gotoh, J Manne, J Igarashi, T Fujita, KA Silverman, H Xhao, YP Mosse, PS White and GM Brodeur (2008). "Expression and sequence analysis of candidates for the 1p36.31 tumor suppressor gene deleted in neuroblastomas." *Oncogene*, 27(6): 803-810.

86. Opel D, C Poremba, T Simon, KM Debatin and S Fulda (2007). "Activation of Akt predicts poor outcome in neuroblastoma." *Cancer Research*, 67(2): 735-745.
87. Paez J and WR Sellers (2003). "PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling." *Cancer Treatment and research*, 115: 145-167.
88. Park JR, A Eggert and H Caron (2010). "Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment." *Hematology/oncology clinics of North America*, 24(1): 65-86.
89. Paterson A (2002). "Adrenal pathology in childhood: a spectrum of disease." *European Radiology*, 12(10): 2491-2508.
90. Pehlivan D, E Gunduz, M Gunduz, H Nagatsuka, LB Beder, B Cengiz, RS Rivera, K Fukushima, S Palanduz, S Ozturk, N Yamanaka and K Shimizu (2008). "Loss of heterozygosity at chromosome 14q is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas." *Journal of cancer research and clinical oncology*, 134(12): 1267-1276.
91. Perel Y, D Valteau-Couanet, J Michon, F Lavrand, C Coze, C Bergeron, A Notz, D Plantaz, P Chastagner, F Bernard, C Thomas and H Rubie (2004). "[Prognosis of neuroblastoma in childhood. Methods of assessment and clinical use]." *Archives de Pédiatrie*, 11(7): 834-842.
92. Petkovic I and M Cepulic (1991). "Cytogenetic analysis of primary neuroblastoma with del(1), del(14), hsr, and dmin chromosomes." *Cancer genetics and cytogenetics*, 55(2): 231-234.
93. Peuchmaur M, ES d'Amore, VV Joshi, J Hata, B Roald, LP Dehner, RB Gerbing, DO Stram, JN Lukens, KK Matthay and H Shimada (2003). "Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular." *Cancer*, 98(10): 2274-2281.
94. Plantaz D, G Mohapatra, KK Matthay, M Pellarin, RC Seeger and BG Feuerstein (1997). "Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybridization." *American Journal of Pathology*, 150(1): 81-89.
95. Polleux F, KL Whitford, PA Dijkhuizen, T Vitalis and A Ghosh (2002). "Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling." *Development*, 129(13): 3147-3160.
96. Sabatini DM, RK Barrow, S Blackshaw, PE Burnett, MM Lai, ME Field, BA Bahr, J Kirsch, H Betz and SH Snyder (1999). "Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling." *Science*, 284(5417): 1161-1164.

97. Sartelet H, LL Oligny and G Vassal (2008). "AKT pathway in neuroblastoma and its therapeutic implication." *Expert Review of Anticancer Therapy*, 8(5): 757-769.
98. Schell M and C Bergeron. Neuroblastoma, 2003 [online]. Europe, Orphanet Encyclopedia, (August 18, 2010). Available at: <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-neuroblastoma.pdf>.
99. Schmidt ML, A Lal, RC Seeger, JM Maris, H Shimada, M O'Leary, RB Gerbing and KK Matthay (2005). "Favorable prognosis for patients 12 to 18 months of age with stage 4 nonamplified MYCN neuroblastoma: a Children's Cancer Group Study." *Journal of Clinical Oncology*, 23(27): 6474-6480.
100. Schwab M, K Alitalo, KH Klempnauer, HE Varmus, JM Bishop, F Gilbert, G Brodeur, M Goldstein and J Trent (1983). "Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour." *Nature*, 305(5931): 245-248.
101. Seeger RC, GM Brodeur, H Sather, A Dalton, SE Siegel, KY Wong and D Hammond (1985). "Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas." *New England Journal of Medicine*, 313(18): 1111-1116.
102. Shimada H, IM Ambros, LP Dehner, J Hata, VV Joshi, B Roald, DO Stram, RB Gerbing, JN Lukens, KK Matthay and RP Castleberry (1999). "The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system)." *Cancer*, 86(2): 364-372.
103. Shimada H, J Chatten, WA Newton, Jr., N Sachs, AB Hamoudi, T Chiba, HB Marsden and K Misugi (1984). "Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas." *Journal of the National Cancer Institute*, 73(2): 405-416.
104. Spitz R, DR Betts, T Simon, M Boensch, J Oestreich, FK Niggli, K Ernestus, F Berthold and B Hero (2006). "Favorable outcome of triploid neuroblastomas: a contribution to the special oncogenesis of neuroblastoma." *Cancer genetics and cytogenetics*, 167(1): 51-56.
105. Srivatsan ES, KL Ying and RC Seeger (1993). "Deletion of chromosome 11 and of 14q sequences in neuroblastoma." *Genes, chromosomes & cancer*, 7(1): 32-37.
106. Suzuki T, J Yokota, H Mugishima, I Okabe, M Ookuni, T Sugimura and M Terada (1989). "Frequent loss of heterozygosity on chromosome 14q in neuroblastoma." *Cancer Research*, 49(5): 1095-1098.

107. Takayama H, T Suzuki, H Mugishima, T Fujisawa, M Ookuni, M Schwab, M Gehring, Y Nakamura, T Sugimura, M Terada and et al. (1992). "Deletion mapping of chromosomes 14q and 1p in human neuroblastoma." *Oncogene*, 7(6): 1185-1189.
108. Takita J, Y Hayashi, T Kohno, M Shiseki, N Yamaguchi, R Hanada, K Yamamoto and J Yokota (1995). "Allelotype of neuroblastoma." *Oncogene*, 11(9): 1829-1834.
109. Takita J, Y Hayashi and J Yokota (1997). "Loss of heterozygosity in neuroblastomas--an overview." *European Journal of Cancer*, 33(12): 1971-1973.
110. Theobald M, H Christiansen, A Schmidt, B Melekian, N Wolkewitz, NM Christiansen, C Brinkschmidt, F Berthold and F Lampert (1999). "Sublocalization of putative tumor suppressor gene loci on chromosome arm 14q in neuroblastoma." *Genes, chromosomes & cancer*, 26(1): 40-46.
111. Thompson PM, BA Seifried, SK Kyemba, SJ Jensen, C Guo, JM Maris, GM Brodeur, DO Stram, RC Seeger, R Gerbing, KK Matthay, TC Matisse and PS White (2001). "Loss of heterozygosity for chromosome 14q in neuroblastoma." *Medical and Pediatric Oncology*, 36(1): 28-31.
112. Toma MI, M Grosser, A Herr, DE Aust, A Meye, C Hoefling, S Fuessel, D Wuttig, MP Wirth and GB Baretton (2008). "Loss of heterozygosity and copy number abnormality in clear cell renal cell carcinoma discovered by high-density affymetrix 10K single nucleotide polymorphism mapping array." *Neoplasia*, 10(7): 634-642.
113. Universités de Fribourg LeB.Embryologie humaine, 2006 [online]. Campus Virtuel Suisse (August 18, 2010). Available at: <http://www.embryology.ch/index.html>.
114. Vandesompele J, M Baudis, K De Preter, N Van Roy, P Ambros, N Bown, C Brinkschmidt, H Christiansen, V Combaret, M Lastowska, J Nicholson, A O'Meara, D Plantaz, R Stallings, B Brichard, C Van den Broecke, S De Bie, A De Paepe, G Laureys and F Speleman (2005). "Unequivocal delineation of clinicogenetic subgroups and development of a new model for improved outcome prediction in neuroblastoma." *Journal of Clinical Oncology*, 23(10): 2280-2299.
115. Vandesompele J, F Speleman, N Van Roy, G Laureys, C Brinkschmidt, H Christiansen, F Lampert, M Lastowska, N Bown, A Pearson, JC Nicholson, F Ross, V Combaret, O Delattre, BG Feuerstein and D Plantaz (2001). "Multicentre analysis of patterns of DNA gains and losses in 204 neuroblastoma tumors: how many genetic subgroups are there?" *Medical and Pediatric Oncology*, 36(1): 5-10.
116. Vandesompele J, N Van Roy, M Van Gele, G Laureys, P Ambros, P Heimann, C Devalck, E Schuurings, P Brock, J Otten, J Gyselinck, A De Paepe and F Speleman (1998). "Genetic heterogeneity of neuroblastoma studied by comparative genomic hybridization." *Genes, chromosomes & cancer*, 23(2): 141-152.

117. Vivanco I and CL Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." *Nature reviews. Cancer*, 2(7): 489-501.
118. Volchenboum SL, C Li, S Li, EF Attiyeh, CP Reynolds, JM Maris, AT Look and RE George (2009). "Comparison of primary neuroblastoma tumors and derivative early-passage cell lines using genome-wide single nucleotide polymorphism array analysis." *Cancer Research*, 69(10): 4143-4149.
119. Wakabayashi Y, J Inoue, Y Takahashi, A Matsuki, H Kosugi-Okano, T Shinbo, Y Mishima, O Niwa and R Kominami (2003). "Homozygous deletions and point mutations of the Rit1/Bcl11b gene in gamma-ray induced mouse thymic lymphomas." *Biochemical and biophysical research communications*, 301(2): 598-603.
120. Walker BA, PE Leone, L Chiecchio, NJ Dickens, MW Jenner, KD Boyd, DC Johnson, D Gonzalez, GP Dagrada, RK Protheroe, ZJ Konn, DM Stockley, WM Gregory, FE Davies, FM Ross and GJ Morgan (2010). "A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value." *Blood*, 116(15): e56-65.
121. Wan L, X Yi, C Quan, D Minghua and Q Minping (2010). "The analysis of biases of copy numbers from Affymetrix SNP arrays." *Communications in Information and Systems*, 10(2): 83-98.
122. Wenzel A and M Schwab (1995). "The mycN/max protein complex in neuroblastoma. Short review." *European Journal of Cancer*, 31A(4): 516-519.
123. Westermann F and M Schwab (2002). "Genetic parameters of neuroblastomas." *Cancer Letters*, 184(2): 127-147.
124. White PS, PM Thompson, BA Seifried, EP Sulman, SJ Jensen, C Guo, JM Maris, MD Hogarty, C Allen, JA Biegel, TC Matisse, SG Gregory, CP Reynolds and GM Brodeur (2001). "Detailed molecular analysis of 1p36 in neuroblastoma." *Medical and Pediatric Oncology*, 36(1): 37-41.
125. Wong KK, JA Engelman and LC Cantley (2010). "Targeting the PI3K signaling pathway in cancer." *Current opinion in genetics & development*, 20(1): 87-90.
126. Woods WG, B Lemieux and M Tuchman (1992). "Neuroblastoma represents distinct clinical-biologic entities: a review and perspective from the Quebec Neuroblastoma Screening Project." *Pediatrics*, 89(1): 114-118.
127. Yamamoto H, T Tobo, M Nakamori, M Imamura, A Kojima, Y Oda, N Nakamura, T Takahira, T Yao and M Tsuneyoshi (2009). "Neurofibromatosis type 1-related gastrointestinal stromal tumors: a special reference to loss of heterozygosity at 14q and 22q." *Journal of cancer research and clinical oncology*, 135(6): 791-798.

APPENDICES

APPENDICE 1 - SOLUTIONS

Carnoy

Ratio 3 méthanol : 1 acide acétique

20x SSC

500 mL H₂O déionisée

87,6 g NaCl (3M)

44,1 g Na Citrate (0,3M)

pH ajusté à 7.0

Autres concentrations de SSC

Solution de travail	Quantité de 20x SSC (mL)	Quantité d'H₂O déionisée (mL)
0,4x SSC	2,0	+ 98,0
2x SSC	10,0	+ 90,0

PBS

2 x 500 mL H₂O déionisée

8,7 g NaCl

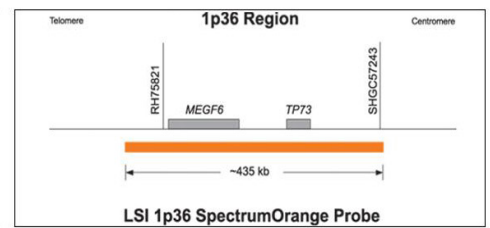
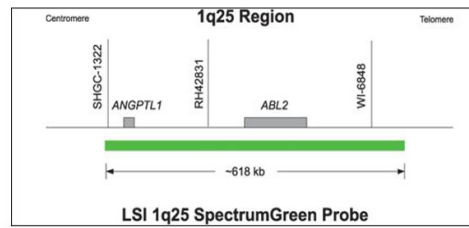
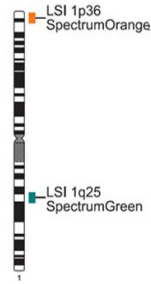
14,2g Na²PO⁴

95 mL NaH²PO⁴

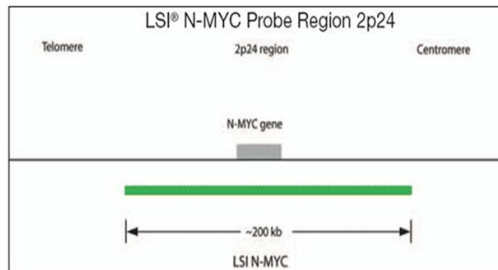
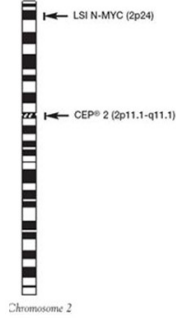
pH ajusté 7.3

APPENDICES 2 – LOCALISATION DES DIFFÉRENTES SONDÉS UTILISÉES À LA FISH

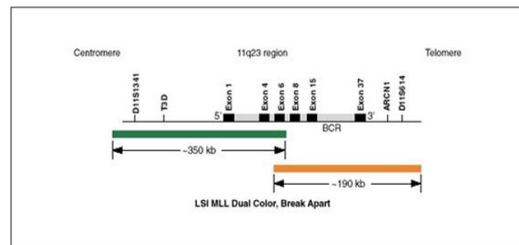
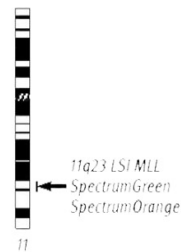
Vysis LSI 1p36 1q25



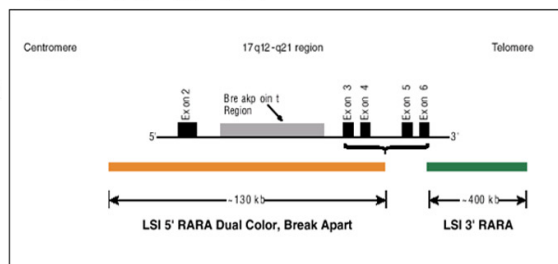
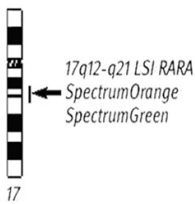
Vysis LSI N-MYC



Vysis MLL Dual Color

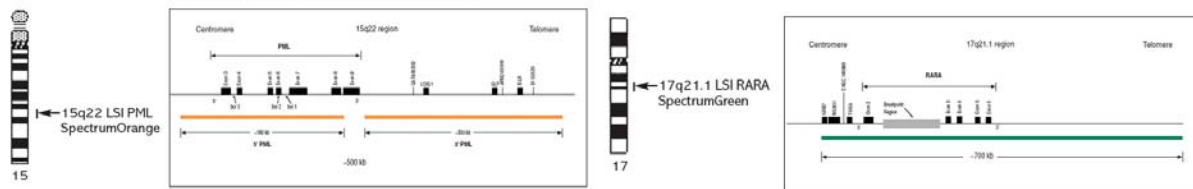


Vysis Rara Dual Color

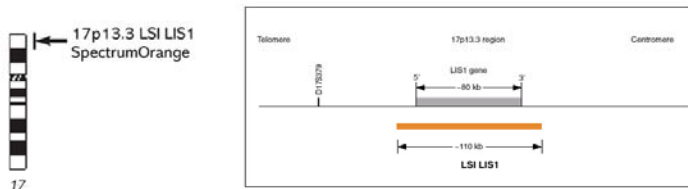


Appendices 2 – suite

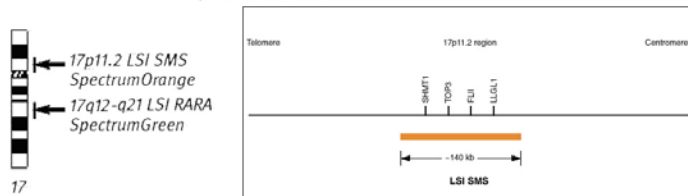
Vysis LSI PML/Rara Dual Color



Vysis Miller-Dieker



Vysis LSI SMS



Tiré de Abbott Molecular.

APPENDICES 3 - FORMULAIRE POUR L'INSCRIPTION DU NOMBRE DE SONDAS LORS DE L'ANALYSE

FISH NOYAUX INTERPHASIQUE

hybridation # : _____

lames # _____

_____ Renseignement clinique

Sondes utilisées : ● / ● (Vysis)

	●● ●●	●●● ●●●	●●●● ●●●●	● ●●	●● ●●●	● R ● V
Décompte						
Total						

Décompte						
Total						

SPECIMEN :

TECHNIQUE UTILISEE :

RÉSULTATS : _____

DATE :

Le numéro d'hybridation, le numéro de lames, le diagnostic supposé (renseignement clinique), les sondes utilisées, le spécimen, la technique et la date ont été inscrits systématiquement. Dans les tableaux ont été indiqués des exemples de décompte de sondes possible. Des cases ont été laissées vides afin de pouvoir ajouter d'autres résultats non attendus. À la fin du décompte, les résultats ont été inscrits.

APPENDICES 4 - DONNÉES CLINIQUES INDIVIDUELLES POUR LES 40 PATIENTS DONT LES TUMEURS ONT ÉTÉ UTILISÉES AU FISH ET/OU AU SNP

Numéro	Technique	Sexe	Stade INSS	Âge au diagnostic (mois)	MYCN COG	Évolution
1	F + S	F	4	> 12	na	D
2	F + S	M	4	> 12	na	D
3	F + S	M	2B	> 12	na	S
4	S	M	4	> 12	na	D
5	S	F	1	< 12	na	S
6	S	F	4	> 12	na	S
7	F + S	F	2B	< 12	na	S
8	F	F	1	< 12	na	S
9	F + S	M	1	> 12	a	S
10	F + S	M	3	> 12	ns	S
11	S	M	4	> 12	ns	D
12	S	F	4	> 12	ns	D
13	F	F	2B	> 12	a	S
14	F + S	F	1	< 12	na	S
15	F + S	F	4S	< 12	na	S
16	F + S	F	3	> 12	na	S
17	F	M	4	< 12	na	S
18	F + S	F	4	< 12	na	S
19	F + S	M	4	< 12	na	S
20	F + S	M	4S	< 12	na	S
21	F	F	1	< 12	na	S
22	S	M	3	> 12	na	S
23	F	F	4	> 12	ns	D
24	S	F	4s	< 12	ns	S
25	F	F	3	< 12	na	S
26	S	F	4	> 12	ns	D
27	F	M	4	> 12	ns	D
28	S	M	2	> 12	na	S
29	F	M	4	> 12	ns	D
30	S	F	3	> 12	na	S
31	F	M	4	> 12	na	D
32	S	M	4	> 12	na	D
33	F	M	1	> 12	ns	S
34	S	F	1	> 12	na	S
35	F	F	4	> 12	na	S
36	S	M	2a	< 12	ns	S
37	F	M	2b	< 12	na	S
38	S	F	4	> 12	na	D
39	F	M	2a	> 12	na	S
40	S	M	2a	< 12	na	S

Les tumeurs ont parfois été utilisées uniquement au FISH ou au SNP, ou aux deux. 25 patients étaient de sexe féminin et 20 de sexe masculin. 25 avaient 12 mois et plus, alors que 15 avaient moins de 12 mois. 12 sont décédés, alors que 24 ont survécu. Technique : F= FISH, S=SNP. Sexe : F= féminin, M= masculin. MYCN COG : a= amplifié, na = non amplifié. ns = non spécifié. Évolution : d = décès, s = survie.

APPENDICES 5 – POURCENTAGE DE NOYAUX AYANT LE PLUS GRAND NOMBRE DE SIGNAUX POUR LES PRINCIPAUX CLONES DE TOUTES LES COMBINAISONS DE SONDE

#	1p36 : 1q35	%	CEP2 : 2p23	%	11q23	%	17 p11 : 17 q21	%
1	3 : 4	38	4 : 4	68	1	87	5 : 5	67
	2 : 2	27	3 : 3	11	2	10	2 : 2	21
	4 : 4	13	2 : 2	10				
	3 : 3	12						
2	2 : 2	82	2 : 2	68	1	76	2 : 3	55
	1 : 1	5	1 : 1	12	2	33	2 : 2	19
							1 : 2	11
3	3 : 3	80	3 : 3	65	2	100	4 : 4	71
	2 : 2	12	2 : 2	27			3 : 3	10
7	3 : 3	85	3 : 3	85	3	87	3 : 3	47
	2 : 2	7	2 : 2	5	2	10	4 : 4	41
8	2 : 2	64	3 : 3	67	2	96	3 : 3	48
	3 : 3	30	2 : 2	20	4	4	2 : 2	33
9	2 : 2	70	3 : 3	54	3	61	2 : 2	54
	3 : 3	26	2 : 2	37	2	39	3 : 3	30
10	2 : 4	74	---	---	2	79	4 : 6	34
	2 : 5	11			3	9	3 : 6	24
	2 : 2	12					2 : 6	15
13	1 : 2	72	---	---	2	nd	2 : 3	nd
14	3 : 3	29						
	2 : 2	28						
	2 : 2	12	3 : 3	68	2	89	3 : 4	38
	1 : 2	12	2 : 2	19	3	7	3 : 3	28
	2 : 3	11					2 : 2	12
15	3 : 3	53	5 : 5	46				
	2 : 2	29	4 : 5	23	2	97	4 : 4	63
	2 : 3	14	2 : 2	12	1R/1V	3	2 : 2	24
16	2 : 2	69	4 : 4	11				
	0 : 4	11	2 : 2	44	2	88	2 : 2	85
	0 : 3	11	3 : 2	32	1	5	2 : 4	7
17	2 : 2	91	4 : 0	17	1R/1V	5		
	2 : 2	94	2 : 2	94	2	85	2 : 2	82
18	1 : 1	2	2 : 3	4	3	8	2 : 3	15
	2 : 2	84	2 : 2	75	2	74	2 : 2	75
	4 : 4	11	3 : 3	12	4	10	4 : 4	10
19	2 : 2	83	2 : 2	74	2	60	2 : 2	45
	4 : 4	7	3 : 3	9	1	35	2 : 4	27
20	3 : 3	86	3 : 3	89	2	96	3 : 3	83
	2 : 3	7	3 : 2	5	3	3	2 : 2	10
21							4 : 4	48
	3 : 3	58	3 : 3	74			4 : 3	18
	2 : 2	22	2 : 2	16	2	100	2 : 2	15
	2 : 3	20					3 : 3	15

Le nombre de signaux compté pour chaque combinaison de sonde peut varier (présence de clones). Les clones apparaissant dans ce tableau sont ceux ayant plus de 10% de cellules avec cette combinaison de sonde ou les deux principaux clones dans la tumeur. Pour être pris en considération dans l'analyse, les pourcentages doivent habituellement être supérieurs à 20%. Sonde : sonde = Combinaisons de sonde utilisées pour un même chromosome, chiffre : chiffre = nombre de signaux retrouvés pour chaque combinaison de sonde, --- = signaux non comptés dû à la présence de l'amplification de *MYCN*, nd = données non disponibles.

CURRICULUM VITAE

FORMATION ACADÉMIQUE

Doctorat en médecine, Université de Montréal, Montréal.	En cours (2009-2013)
M.Sc en pathologie et cytogénétique, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine et Université de Montréal, Montréal.	En cours (09-2008-?)
BAC en sciences biomédicales, Université de Montréal, Montréal.	Décembre 2007
DEC en sciences de la nature, CÉGEP de Rimouski, Rimouski.	Mai 2005
Diplôme secondaire V au Programme d'Éducation Internationale (DES et DÉSI), École Paul-Hubert, Rimouski.	Juin 2003

AUTRES FORMATIONS

Colloque médical étudiant du Québec, Université de Montréal, Montréal.	16 janvier 2010
Symposium de médecine familiale, Université Laval, Québec.	19 septembre 2009
Retraite scientifique de l'axe maladies virales, immunitaires et cancer Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montréal.	15-16 avril 2009
Réunions annuelles (3) de l'Association des Cytogénéticiens du Québec	2007-2009
Stage de laboratoire en génétique, Laboratoire Dre Nicole Lemieux, Université de Montréal, Montréal.	Été 2007
Atelier de formation annuel de l'Association des Conseillères et Conseillers en génétique du Québec (ACCGQ), CHU Sainte- Justine, Montréal.	25 mai 2007
Colloque printanier du Réseau de recherche en santé environnementale, Montréal.	24 mai 2007

EXPÉRIENCES DE TRAVAIL PERTINENTES

Stage d'été en médecine clinique SARROS, CSSS du Rocher-Percé	Juin 2010
Coordonnatrice du volet épigénétique de l'Étude Longitudinale du Développement des Enfants du Québec (ELDEQ), pour le Groupe de recherche sur l'inadaptation psychosociale chez l'enfant (GRIP), Université de Montréal, Montréal.	01-2009 à 08-2009
Assistante à la coordination, volet santé de l'ELDEQ pour le GRIP et le Groupe de Recherche Interdisciplinaire en Santé (GRIS), Université de Montréal, Montréal.	10-2008 à 08-2009
Surnuméraire de recherche, volet santé de l'ELDEQ CHU Sainte-Justine, Montréal.	02-2008 à 10-2009
Agent de recherche clinique en médecine vasculaire Hôtel-Dieu du CHUM, Montréal.	01-2008 à 11-2008
Auxiliaire d'enseignement, Université de Montréal, Montréal.	2008
Accompagnatrice pour personnes âgées atteintes du cancer, bénévolat à l'Hôtellerie Omer Brazeau, Rimouski.	2004

PRÉSENTATIONS (AUTEURS, TITRE, OCCASION, LIEU, DATE)

ORALES

1. Arsenault MP, Nyalendo C, Cournoyer S, Duval M, Fetni R et H Sartelet. *Anomalies en 14q et du gène AKT dans le neuroblastome*, 78^e congrès de l'Association francophone pour le savoir (ACFAS), Université de Montréal, Montréal, 10 mai 2010.
2. Arsenault MP, Cournoyer S, Rougemont AL, Oligny LL, Vassal G, Fetni R et H Sartelet. *L'activation de la voie PI3K/AKT et sa régulation par la thiorédoxine dans le neuroblastome*, 26^e journée scientifique du département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, 22 octobre 2009.
3. Arsenault MP, Fetni R et H Sartelet. *Les facteurs cytogénétiques dans le pronostic du neuroblastome et l'apport de la recherche*, Réunions de recherche du département de pathologie et cytogénétique du CHU Sainte-Justine, Montréal, 5 juin 2009.
4. Arsenault MP et H Sartelet. *Théorie des cellules souches cancéreuses et neuroblastome*, Séminaires du département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, 20 avril 2009.
5. Arsenault MP et H Sartelet. *Étude des cellules souches dans le neuroblastome*, Réunions cliniques d'oncologie, CHU Sainte-Justine, Montréal, 18 février 2009.

PAR AFFICHE

1. Arsenault MP, Roy-Tourangeau M, Samson Y, Lemieux N, Sartelet H et R Fetni. *Stratégie de détection des anomalies chromosomiques par FISH interphasique pour le pronostic du neuroblastome*, Congrès annuel des étudiants gradués du CHU Sainte-Justine, Montréal, 2 juin 2009.
2. Arsenault MP, Roy-Tourangeau M, Samson Y, Lemieux N, Sartelet H et R Fetni. *Stratégie de détection des anomalies chromosomiques par hybridation in situ interphasique en fluorescence pour le pronostic du neuroblastome*, Journée annuelle de l'Association des Cytogénéticiens du Québec, Université Laval, Québec, 24 avril 2009.

HABILITÉS, COMPÉTENCES ET RÉALISATIONS

Trésorière de l'Association des Étudiantes et Étudiants en Médecine de l'Université de Montréal (2010-2011), Montréal.	Depuis mai 2010
Participation à un forum sur la santé, émission « Ados-Radio » [enregistrement], Première chaîne radio de Radio-Canada, Montréal.	4 février 2010
Bourse d'excellence du département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal.	2008-2010
Représentante des étudiants au cycle supérieur du département de pathologie au comité des étudiants au cycle supérieur du CHU Sainte-Justine, Montréal.	2008-2009
Conseillère au comité du bal des étudiants en Sciences biomédicales, Université de Montréal, Montréal.	2007-2008
Secrétaire de l'Association des Étudiants en Sciences biomédicales de l'Université de Montréal (AÉSBUM), Montréal.	2006-2007
Participation au Forum international Sciences et Société, cégep Montmorency, Laval et lauréate d'un voyage de découverte scientifique à Paris.	2004-2005
Conseillère au comité des étudiants en Sciences de la nature, Cégep de Rimouski, Rimouski.	2004-2005

