

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**IDENTIFICATION ET IMPACTS DES ANOMALIES
GÉNÉTIQUES DANS LA GENÈSE, L'ÉVOLUTION
CLINIQUE ET LE TRAITEMENT DES GLIOMES**

Par

Mr Macoura GADJI

à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé

en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D)

dans le programme de Biochimie

Thèse présentée le 31 Mai 2010

Évaluateurs :

Dr Josée Hébert, MD: Professeure agrégée de médecine, Département de médecine, Faculté de médecine, Université de Montréal, **examinatrice externe**

Dr Cherif Abou-Elala, PhD : Professeur titulaire, Département de microbiologie – infectiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, **examineur interne à l'Université de Sherbrooke mais externe au programme de biochimie**

Dr Marcel Bastin, PhD: Professeur titulaire, Département de biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, **examineur interne à l'Université de Sherbrooke et interne au programme de biochimie**

Dr Régen Drouin, MD, PhD : Professeur titulaire, Service de génétique, Département de pédiatrie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, **directeur de recherche**



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-83337-7

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-83337-7

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Résumé

Les gliomes ou tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes résultent de la prolifération incontrôlée de certaines cellules du cerveau qui sont les astrocytes et les oligodendrocytes. C'est ce qui les différencie des tumeurs cérébrales secondaires ayant pour origine une tumeur située ailleurs dans l'organisme par exemple le poumon, le sein ou le rein et qui donne des métastases au niveau du cerveau. Selon la cellule impliquée pour donner cette tumeur cérébrale primaire, on distingue les oligodendrogliomes (grades II et III), les oligoastrocytomes mixtes (grades II et III) et les astrocytomes (grades I, II, III et IV ou glioblastome). Leur cause est inconnue mais de manière générale un cancer est une maladie génétique de la cellule qui évolue dans le temps. Leur diagnostic histopathologique est souvent l'objet de controverse à cause du manque de marqueurs immunohistologiques spécifiques à ces tumeurs. Leur traitement est basé sur la chirurgie accompagnée de traitements adjuvants (chimiothérapie et radiothérapie). Ces tumeurs ont la capacité d'infiltrer le parenchyme normal environnant rendant impossible une exérèse chirurgicale complète d'où la pertinence des traitements adjuvants. L'évolution de ces tumeurs malignes est presque toujours fatale et au stade de glioblastome la survie moyenne ne dépasserait guère 15 mois. C'est pourquoi, la recherche des bases moléculaires et génétiques de ces tumeurs s'avère indispensable pour permettre l'émergence de nouvelles cibles thérapeutiques et l'amélioration de la thérapie moléculaire ciblée. En utilisant des techniques de cytogénétique conventionnelle et moléculaire et de génétique moléculaire, nous avons investigué ces tumeurs au CHUS. Concomitamment, nous avons créé et développé une banque de tumeurs cérébrales

qui contient aujourd'hui plus de 150 échantillons de tumeurs cérébrales prélevées chez autant de patients. Nos résultats ont montré que la perte du bras court du chromosome 1 (1p-) et du bras long du chromosome 19 (19q-), (1p-/19q-), au delà de sa qualité de marqueur pronostique et prédictif des oligodendrogliomes, en est aussi un marqueur diagnostique. De plus, nous avons développé une méthode rapide, efficace et reproductible pour déterminer la présence de la 1p-/19q- dans les cellules tumorales. Nous avons aujourd'hui transférée notre méthode de recherche de la 1p-/19q- dans les oligodendrogliomes au laboratoire clinique. Nous avons également déterminé le seuil de positivité de la technique FISH pour la détermination de ces délétions, qui est de 20%. Nous avons également réussi à mettre au point une méthode de mise en culture et de récolte pour obtenir des métaphases analysables à partir des tumeurs cérébrales primaires. Ceci nous a permis d'établir leurs caryotypes et de trouver une autre translocation chromosomique qui pourrait être à l'origine de la délétion 1p dans un cas d'oligoastrocytome. En effet, cette translocation que nous avons trouvée nous a fourni des pistes de compréhension du mécanisme amenant la délétion du seul chromosome 1p qui est présente dans une tumeur oligoastrocytaire. En nous basant sur nos résultats, nous avons montré que l'organisation en trois dimensions des télomères au sein du noyau de la cellule tumorale est un biomarqueur fiable de l'évolution clinique des glioblastomes qui est la composante la plus maligne de ces tumeurs. Nous avons aussi établi une méthode simple et efficace d'utilisation de ce biomarqueur en clinique pour permettre une meilleure prise en charge médicale des patients atteints de glioblastomes. Cette méthode semi-automatique permet d'établir l'organisation nucléaire en trois dimensions en neuf heures de temps après réception

de l'échantillon. Cette technique pourrait être facilement transférable en clinique. C'est pourquoi, ce biomarqueur pourrait également être utilisé pour évaluer l'efficacité de la réponse aux nouvelles thérapies moléculaires ciblées. L'identification des gènes suppresseurs de tumeurs localisés sur les bras chromosomiques 1p et 19q et la compréhension moléculaire de l'organisation en trois dimensions des télomères dans les gliomes permettrait de dégager de nouvelles pistes thérapeutiques intéressantes.

Mots Clés : Gliomes, anomalies chromosomiques, instabilité génétique, instabilité génomique, 1p/19q, télomères, architecture nucléaire, EGFR.

Abstract

Human gliomas represent the most common primary brain tumours in adults. According to World Health Organization classification, gliomas are divided into astrocytomas with four grades (I, II, III, and IV), oligodendrogliomas with two grades (II and III), and oligoastrocytomas with two grades (II and III) based on the tumor cell phenotype. Pathological classification remains controversial due to the lack of specific immunohistochemical biomarker to recognize gliomas. Also, due to their natural propensity to infiltrate the normal parenchyma and to migrate far from the first location, total surgical resection remains often impossible then adjuvant treatment is needed. The established therapies for gliomas include surgery, radiotherapy and chemotherapy. Despite this arsenal of therapies, median survival of the most malignant grade glioblastoma is approximately 15 months. This is why

the attempts to better understand the molecular biology of gliomas in the aim to define new molecular targets is a holy grail. Using conventional and molecular cytogenetic approaches and molecular genetic methods, we have investigated patients bearing gliomas and followed at CHUS. Our results display that the codeletion 1p/19q (1p-/19-) is not only a prognostic and predictive biomarker of oligodendrogliomas but also a diagnostic tool of this tumor. Our study has allowed us to build a glioma-bank containing around 150 samples of patients, which we continued to populate. We have also defined the cut-off positivity of FISH on touch preparation slides, which is 20%. In addition, we have developed a new, fast and reliable method to retrieve the 1p-/19q- in all samples 24 hours after sampling. This method was transferred to the clinical lab. Furthermore, we have successfully cultured the brain tumor samples and analyzed their karyotypes. This has permitted us to discover a new alternative translocation, which is responsible of 1p deletion in one oligoastrocytoma case. Since glioblastoma is characterized by genomic instability, and telomere disruption is a main cause of genomic instability, we investigated the nuclear telomere architecture in this type of tumour. We found that nuclear telomeric architecture could be a biomarker of glioblastoma since it can subdivide glioblastoma patients in three categories with significantly different outcomes and time to progression. We used high-throughput methods (one manual and one semi-automatic) to characterize the nuclear telomeric architecture in glioblastoma. The semi-automatic method can be transfer to the clinical lab since it can deliver the results nine hours after sampling. Then, this approach is usable to monitor this tumor and to evaluate the impact of different treatment options. We need to search the putative tumor suppressor genes on chromosomes 1 and 19.

Furthermore, trying to understand the molecular basis of nuclear telomeric architecture will bring up new molecular target therapies.

Keywords : Gliomas, chromosomal abnormalities, genetic instability, genomic instability, 1p/19q, telomeres, nuclear architecture, EGFR.

Avant-Propos de la thèse

Cette thèse comporte une insertion de quatre articles dont trois sont déjà publiés et le quatrième est en évaluation dans la revue *American Journal of Surgical Pathology*. Je suis l'auteur principal de tous ces articles. Le Dr David Fortin qui traite et suit les patients a fourni les renseignements cliniques et la Dre Tsanaclis a fait le diagnostic pathologique des tumeurs. Les deux participent activement au projet pour les différents échantillons et la mise en place de la banque des tumeurs cérébrales « Glioma-Bank ». J'ai initié et mis sur pied le projet « tumeurs cérébrales » sur lequel j'écris ma thèse. J'ai géré ce projet avec les docteurs Tsanaclis et Fortin sous la supervision de mon directeur de recherche, le Dr Drouin. Pour solidifier ma formation, j'ai participé activement à la rédaction des demandes de fonds pour ce projet dont j'ai toujours écrit la première version et fourni les résultats préliminaires sur lesquels était basée la demande. Durant ma formation doctorale, j'ai travaillé en plus sur un autre projet dénommé « cellules fœtales » avec le Dr Kada Krabchi durant son doctorat. J'ai géré ce projet pendant 2 ans après la fin de son doctorat. Ce projet nous a permis d'écrire quelques articles (voir mes publications et communications durant mon doctorat en annexe). J'ai également présenté nos résultats à des congrès très prestigieux comme l'ASHG (American Society of Human Genetics) et l'AACR (American Association for Cancer Research). J'ai gagné le 2^{ième} Prix Invitrogen de la meilleure présentation lors du 12^{ième} Symposium scientifique du Département de Biochimie. J'ai aussi été le conférencier invité au Congrès des Neurochirurgiens du Québec (ANCQ) et à la journée de formation continue de Neuropathologie de l'Université de Sherbrooke.

Tout récemment, mon résumé a été accepté pour une présentation orale au congrès 7th Canadian Symposium on Telomeres and Telomerase qui s'est tenu du 13 au 16 mai 2010 à McMaster University à Hamilton, Ontario. Tout au long de ce cursus doctoral, j'ai suivi avec succès de manière optionnelle des cours pour l'équivalent de 10 crédits. J'ai également obtenu le diplôme « d'enrichissement des compétences en recherche » de l'Université de Sherbrooke qui est équivalent à 15 crédits. J'ai également effectué des tâches académiques comme encadrement de deux étudiantes du baccalauréat pour leur stage de recherche en laboratoire, une étudiante pour ses travaux pour sa maîtrise de Biochimie et plusieurs étudiants et stagiaires d'été. J'ai enfin agi comme démonstrateur dans le programme de baccalauréat de Biochimie en 2003-2004 et aussi comme professeur – tuteur de biologie médicale II pour l'enseignement des étudiants de première année de médecine à l'Université de Sherbrooke pendant deux années (2007-2008 et 2008-2009) par la méthode APP (Apprentissage par Résolution de Problèmes).

Table des matières

| | |
|--|------|
| TABLE DES MATIÈRES | I |
| LISTE DES TABLEAUX | VI |
| LISTE DES FIGURES | VIII |
| LISTE DES SIGLES, ABRÉVIATIONS, ET SYMBOLES | XIII |
| RÉSUMÉ | |
| ABSTRACT | |
| 1. INTRODUCTION | 1 |
| 1.1. Généralités sur le cancer | 2 |
| 1.2. Génétique, biologie cellulaire et moléculaire du cancer | 3 |
| 1.3. Les gliomes ou tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes | 6 |
| 1.4. Anomalies chromosomiques et cancer | 12 |
| 1.5. Cytogénétique et cytogénomique des gliomes | 24 |
| 1.6. Télomères et leur régulation dans les gliomes | 29 |
| 1.7. Architecture nucléaire en trois dimensions et territoires chromosomiques | 34 |
| 1.8. Biomarqueurs et gliomes | 37 |
| 1.9. Objectifs de notre recherche | 41 |
| 1.9.1. Contexte | 41 |
| 1.9.2. Objectifs généraux | 43 |
| 1.9.3. Objectifs spécifiques par chapitre | 43 |
| 1.9.3. Objectifs spécifiques par chapitre | 43 |

| | |
|--|-----|
| 2. RÉSULTATS | 47 |
| CHAPITRE 1 : OLIGODENDROGLIOMES ET OLIGOASTROCYTOMES | 48 |
| ARTICLE 1: Is the 1p/19q deletion a diagnostic marker of oligodendrogliomas? | 49 |
| Résumé | 50 |
| Abstract | 53 |
| Introduction | 54 |
| Materials and Methods | 57 |
| Results | 61 |
| Discussion | 75 |
| Conclusions | 81 |
| Acknowledgements | 82 |
| References | 83 |
| ARTICLE 2: A new der(1;7)(q10;p10) leading to a singular 1p loss in a case of anaplastic oligoastrocytoma | 91 |
| Résumé | 92 |
| Abstract | 95 |
| Introduction | 97 |
| Clinical Report | 98 |
| Materials and Methods | 99 |
| Results | 103 |
| Discussion | 109 |

| | |
|--|------------|
| Conclusion | 111 |
| Aknowledgements | 111 |
| References | 112 |
| CHAPITRE 2: LES ASTROCYTOMES ET LES GLIOBLASTOMES | 115 |
| Article 1: Three-dimensional (3D) nuclear telomere architecture is associated with differential time to progression and overall survival in glioblastoma patients | 116 |
| Résumé | 121 |
| Abstract | 125 |
| Introduction | 127 |
| Materials and Methods | 129 |
| Results | 134 |
| Discussion | 146 |
| Conclusion | 150 |
| Aknowledgements | 150 |
| References | 151 |
| 3. DISCUSSION GÉNÉRALE | 156 |
| 3.1. les délétions 1p/19q dans les oligodendrogliomes | 158 |
| 3.2. Les translocations chromosomiques génératrices de la délétion 1p/19q | 162 |
| 3.3 Organisation nucléaire et translocations chromosomiques dans les oligodendrogliomes | 163 |

| | |
|---|-----|
| 3.4. Télomères et organisation télomérique nucléaire comme biomarqueurs dans les gliomes | 170 |
| 3.5. Instabilité génomique et glioblastome | 172 |
| 3.6. Nouvelles stratégies thérapeutiques dans les gliomes | 177 |
| 4. CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES | 179 |
| 5. BIBLIOGRAPHIE | 190 |
| 6. CHAPITRE 3 (Annexe) | 219 |
| Article 1: EGF receptor inhibitors in the treatment of glioblastoma multiform : old clinical allies and newly emerging therapeutic concepts | 220 |
| Résumé | 223 |
| Abstract | 226 |
| 1- Introduction | 227 |
| 2- Pathology of GBM | 228 |
| 3- EGF receptor and mutant forms in GBM | 230 |
| 4- EGF receptor targeted treatment in GBMs | 233 |
| 5- Combinatorial thérapies and new therapeutic concepts for GBM | 241 |
| 6- Cancer stem cells (CSC) in glioblastoma and therapeutic challenges | 242 |
| Aknowledgements | 245 |
| References | 245 |
| 7. REMERCIEMENTS | 266 |

8. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS (DOCTORAT)

270

Liste des tableaux

❖- INTRODUCTION

Tableau 1 : Les principales protéines impliquées dans la prolifération, la migration et l'angiogenèse des gliomes.....11

Tableau 2 : Principales techniques et les anomalies détectées.....24

Tableau 3 : Les protéines du complexe shelterin et leurs fonctions.....31

❖- CHAPITRE 1 : Les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes

Article 1 : Is the 1p/19q deletion a diagnostic marker of oligodendrogliomas?

Table 1: FISH findings for 1p and 19q deletions, by histologic type in 37 brain tumor patients originally diagnosed as oligodendrogliomas or oligoastrocytomas patients.....63

Table 2: Clinical data, with treatment and outcome, and FISH and LOH findings for 37 brain tumor patients originally diagnosed as oligodendrogliomas or oligoastrocytomas patients63

Table 3: Loss of heterozygosity studies in 11 brain tumor patients originally diagnosed as oligodendrogliomas or oligoastrocytomas patients.....71

❖- CHAPITRE 2 : Les astrocytomes et les glioblastomes

Article 1 : Three-dimensional (3D) nuclear telomere architecture is associated with differential time to progression and overall survival in glioblastoma patients

Table 1: Clinical data of the population cohort studied.135

❖- CHAPITRE 3 (annexe) : Traitement et nouvelles stratégies thérapeutiques des tumeurs cérébrales

Article 1 : EGFR inhibitors in the treatment of glioblastoma multiform: old clinical allies and newly emerging therapeutic concepts.

Table 1. Examples of treatment regimes involving EGF receptor inhibitors in malignant glioma.....233

Liste des figures

☛-INTRODUCTION

Figure 1 : Présentation histologique des gliomes : a) GBM; b) astrocytome; c) astrocytome anaplasique; d) oligodendrogliome; e) oligoastrocytome avec composante oligodendrogliale à gauche et composante astrocytaire à droite et f) oligodendrogliome anaplasique. (Coloration hématoxilline & éosine; X 400) (Images extraites de la banque de données de notre cohorte de patients).....7

Figure 2 : a) Résonance magnétique en pondération T1 rehaussée de gadolinium, démontrant la présence d'une lésion rehaussante hétérogène, à centre nécrotique, impliquant la région mésiale à temporale droite. A noter l'œdème vasogénique péri-tumoral important. A la pathologie, un diagnostic de glioblastome a été rapporté.

b) Résonance magnétique, pondération T1 rehaussé au gadolinium axiale chez une patiente de 42 ans porteuse d'un oligodendrogliome récidivant. A noter la récurrence tumorale dans la cavité de résection, ainsi que le nodule satellite prenant le genou du corps calleux et traversant dans l'hémisphère gauche (Images extraites de la banque de données de notre cohorte de patients).....9

☛- CHAPITRE 1 : Les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes

Article 1 : Is the 1p/19q deletion a diagnostic marker of oligodendrogliomas?

Fig. 1: (A,B) Fluorescence in situ hybridization (FISH) with LSI 1p36 (SpectrumOrange)-1q25 (SpectrumGreen) probes on (A) touch preparation smear

slide and (B) 5- μ m-thick paraffin section. (C,D) FISH with LSI 19q13 (SpectrumOrange)-19p13 (SpectrumGreen) probes on (C) touch preparation smear slide and (D) 5- μ m-thick paraffin section. (E,F) FISH on touch preparation slides in which the polyploid nuclei display 1p and 19q deletions: (E) LSI 1p36 (SpectrumOrange)-1q25 (SpectrumGreen) probes and (F) LSI 19q13 (SpectrumOrange)-19p13 (SpectrumGreen) probes. Imbalance between red spots and green spots indicates deletion of 1p or 19q. (B,D) Arrows indicate the nonoverlapping nuclei, which can be scored in 5- μ m-thick paraffin section.....68

Fig. 2: Signal distribution analysis using only FISH on touch preparation slides of chromosome 1 (A) and chromosome 19 (B) indicates significant variation between the short and long arms for the two chromosomes in group 1 and group 2 signals ($P = 0.0001$) (ANOVA test, SAS software version 9). These statistics determine the percentage of cells with a deletion required to assign the deleted status to the tumor, which was established as 20%.....69

Fig. 3: Loss of heterozygosity analysis using microsatellite markers specific to (A,B) chromosome 1 and to (C,D) chromosome 19. Lane 1, blood DNA; lane 2, tumor DNA; lane 3, saliva DNA. Arrows indicate allelic losses.....70

Fig. 4 : Kaplan-Meier survival curves comparing (A) combined 1 p and 19q deletion vs. no deletion ($P = 0.002$), (B) oligoastrocytoma with combined 1p and 19q deletion vs. no deletion ($P = 0.007$), (C) histological grade across all patients (P

= 0.254), and (D) oligodendroglioma vs. Oligoastrocytoma ($P = 0.161$).

Abbreviations: mixte, oligoastrocytoma; ana mixte, anaplastic oligoastrocytoma;
oligo, oligodendroglioma; ana oligo, anaplastic oligodendroglioma.74

**Article 2 : A new der(1;7)(q10;p10) leading to a singular 1p loss in a case of
anaplastic oligoastrocytoma**

Figure 1: Different sections of the tumor showing the characteristic aspect of an oligodendroglioma (A) and the astrocytic component (B). Note the extensive microvascular proliferation in A. Hematoxylin and eosin. (400 X original magnification.).....104

Figure 2: GTG-Karyotypes (A, B) and mFISH (C, D) with MetaSystems 24 XCyte 24-color kit on metaphases of the tumor showing the translocation between chromosomes 1 and 7: der(1;7)(q10;p10) indicated by black (A, B) and red (C, D) arrows. The white arrows (C, D) indicate overlapping chromosomes in spread metaphases.....106

Figure 3: FISH using: (A) LSI 1p36/1q25 and (B) LSI 19q13/ 19p13 - dual-color probe sets; (C) LSI TP53 (Spectrum Orange)/CEP 17 (Spectrum Green); (D) LSI PTEN (Spectrum Orange)/CEP 10 (Spectrum Green); and (E) LSI c-MYC (Spectrum Orange); on touch preparation slides of the tumor.....108

CHAPITRE 2 : Les astrocytomes et les glioblastomes

Article 1 : Three-dimensional (3D) nuclear telomere architecture is associated with differential time to progression and overall survival in glioblastoma patients

Figure 1: Two-dimensional (a; c; e) and three-dimensional images (b; d; f) of human GBM nuclei (blue) and their telomeres (red) imaged and visualized with AxioVision 4.6. Nuclear telomere distribution patterns define telomeric aggregates indicated with an arrow in the three categories of patient: (a; b) from P7 in category I; (c; d) from P9 in category II; and (e; f) from P1 in category III. The arrows point to the telomere aggregates.139

Figure 2: Number of telomeres vs. relative intensities of fluorescent signal analyzed by TeloView™. Lines and arrows define the three categories of cells. (a) Category I, P7; (b) category II, P9; (c) category III, P1. (p = 0.0275)..... 140

Figure 3: Screenshots of human GBM nuclei (blue) and telomeres (red) with ScanView 6.0™. Displayed here: Upper panel: Screenshot of a selected field of the gallery of 20 scanned cells. Bottom panel: The corresponding histogram showing the distribution of classified defined cells based on the number of telomeres/cell. (a) Category I, P7; (b) category II, P9; and (c) category III, P1. For patient details, see Table 1.141

Figure 4: Kaplan-Meier curves depicting the TTP and overall survival of the three categories of population defined by telomere organization.....143

Figure 5: a) Human GBM nuclei presenting breakage-bridge-fusion (BBF), with their telomere distribution. Arrows point to nuclear bridges indicative of breakage-bridge-fusion cycles. **b)** Human GBM nuclei presenting nuclear fusion. These data are observed in all three patient categories. A qualitative evaluation showed that these characteristic figures of GBM are most prominent in category III, followed by category II and category I.....145

CHAPITRE 3 (annexe) : Traitement et nouvelles stratégies thérapeutiques des tumeurs cérébrales

Article 1 : EGFR inhibitors in the treatment of glioblastoma multiform: old clinical allies and newly emerging therapeutic concepts.

Figure 1. EGF receptor family members with some of their preferred ligands, including epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor alpha (TGFA), heparin-binding EGF (HB-EGF), amphiregulin (AREG), epigen (EPGN), betacellulin (BTC), epiregulin (EREG), and neurogulins (NRGs).....231

Figure 2. EGF receptor wildtype and its variant mutants in GBM.....232

Liste des sigles, abréviations et symboles

| | |
|-------------------|--|
| 19q- | Délétion du bras long du chromosome 19 |
| 1p- | Délétion du bras court du chromosome 1 |
| 2D | Deux dimensions |
| 3D-QFISH | Three Dimensional QFISH / QFISH en trois dimensions |
| aCGH | Array- Comparative Genomic Hybridization / Hybridation génomique comparative sur puce |
| AKT1 | v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 / famille de gènes encodant des protéines à sérine thréonine kinase |
| ALT | Alternative Lengthening of Telomere / Allongement alternatif des télomères |
| AML ou LAM | Acute myeloid leukemia / Leucémie aiguë myéloïde |
| APB | ALT-associated Promyelocytic Leukemia body / Corps leucémique promyélocytaire associé à l'allongement alternatif des télomères |
| AREG | Amphiregulin / Amphiréguline |
| ARNm | ARN messenger |
| AT | Ataxia telangiectasia / Ataxie télangiectasie |

| | |
|-------------------|---|
| ATM | Ataxia telangiectasia mutated / Gène muté de l'ataxie télangiectasie |
| ATR | Ataxia telangiectasia and Rad3 related / Ataxie télangiectasie et similaire à Rad3 |
| BAC | Bacterial artificial chromosome / Chromosome bactérien artificiel |
| BBF | Breakage Bridge Fusion / Cassures pontages et fusions Gène de fusion entre les gènes : breakpoint cluster region / c-abl, (Abelson) oncogène 1, le gène de fusion a une activité tyrosine kinase |
| BCR/ABL1 | Breast Cancer Resistance Protein / Member of the ATP-binding cassette sub-family G (White), member 2 of drug transporters |
| BCRP/ABCG2 | Bone Morphogenetic Proteins / Protéine osseuse morphogénétique |
| BMP1 | Breast cancer early onset genes 1 and 2 / Gènes 1 et 2 du cancer du sein |
| BRCA1,2 | Betacellulin / β -celluline |
| BTC | |

| | |
|---------------------|--|
| BUB1,3 | Budding uninhibited by benzimidazoles 1 and 2 homologs : Mitotic checkpoint serine threonine-protein kinase BUB 1 et 3) / Point de contrôle mitotique par la protéine kinase sérine/thréonine BUB1,3 |
| BuBR1 | BuB1-related kinase / Kinase associée à Bub1 |
| c-MYC ou MYC | Myelocytomatosis proto-oncogene / Proto-oncogène associé à la myélocytomatose |
| CA | Cytosine et Adenine |
| CAMTA1 | Calmodulin binding transcription activator gene 1 |
| CCDC26 | Coiled-coil domain containing 26 |
| CD133 | Prominin1 / Cluster Differentiation 133 / Classe 133 de différenciation |
| CD31 | Cluster Differentiation 31 / Classe 31 de différenciation |
| CDC4 | Cell division control protein 4 / Protéine 4 de contrôle de la division cellulaire |
| CDK4 | Cycline dependent kinase 4 / Cycline 4 dépendante des kinases |
| CDKN2A | Cycline- dependent kinase inhibitor 2A / Cycline 2A dépendante des kinases |

| | |
|----------------|--|
| CDKN2B | Cycline dependent kinase inhibitor 2B / Cycline 2B dépendante des kinases |
| CDKN2C | Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C / Cycline 2C dépendante des kinases |
| cDNA | ADN complémentaire |
| CEP | Centromere enumerating probe / Sonde centromérique |
| CGH | Comparative Genomic Hybridization / Hybridation génomique comparative |
| CHK2 | Checkpoint kinase 2 du cycle cellulaire |
| CHUS | Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke |
| CIN | Chromosome Instability / Instabilité chromosomique |
| CML/LMC | Chronic Myeloid Leukemia / Leucémie myéloïde chronique |
| CNTS | Centre National de Transfusion Sanguine |
| CNV | Copy number variation / Variation du nombre de copies |
| CSC | Cancer Stem Cells / Cellules souches cancéreuses |
| CSF | Cerebral Spinal Fluid / Liquide céphalo-rachidien |
| Ct-scan | Tomographie par ordinateur |
| Cy3 | Cyanine dye 3 |
| DAPI | 4',6'-diamidino-2-phénylindole |

| | |
|-------------------------|---|
| der(1;7) | Un chromosome dérivé qui résulte d'une translocation entre les chromosomes 1 et 7 |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DNA/ADN | Deoxyribonucleic acid / acide désoxyribonucléique |
| DNET | Dysembryoplastic neuroepithelial tumours |
| dNTP | Dinucleotide triphosphate |
| DSB | Double-strand breaks / cassures bicaténares |
| EGFR/ | Epidermal Growth factor Recepteur / Récepteur du facteur de croissance épidermique |
| EGFRvI | Variant I du récepteur de EGF |
| EGFRvII | Variant II du récepteur de EGF |
| EGFRvIII | Variant III du récepteur de EGF |
| EHD (2, 3, et 4) | EH [Eps 15 (epidermal growth factor receptor pathway substrate 15) Homology] domain-containing proteins / Protéines contenant un domaine EH |
| ERBB2/HER2/neu | v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral homolog 2, neuro / Glioblastoma derived oncogene homolog (avian) |
| EREG | Epiregulin / Épiréguline |
| ERK | Ets (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene) Related Gene : Voie de transduction du signal cellulaire MAPK / ERG |

| | |
|------------------------|--|
| FISH | Fluorescent In Situ Hybridization / Hybridation in situ observée en fluorescence |
| FLAIR | Fluid Attenuation Inversion Recovery |
| G0 | Période G0 du cycle cellulaire |
| G1 | Période G1 du cycle cellulaire |
| G2 | Période G2 du cycle cellulaire |
| GBM | Glioblastoma multiform / Glioblastome multiforme |
| GBMO | Glioblastome multiforme avec une composante oligodendrogliale |
| GFAP | Glial Fibrillary Acidic protein / Protéine fibrillaire gliale acide |
| GIST | Gastrointestinal stromal tumours / Tumeurs du stroma gastro-intestinal |
| GLTSCR (1 et 2) | Glioma tumor suppressor candidate threonine gene (1 et 2). |
| GT | Guanine et Thymine |
| GTG | G-Banding by Trypsin using Giemsa / Marquage en bande G par traitement à la trypsine et coloration au Giemsa |
| HB-EGF | Heparin binding-EGF / Héparine qui lie le facteur EGF |

| | |
|------------------|--|
| HBSS | Hank's balanced salt solution / Solution saline équilibrée de Hank |
| HCl | Acide chlorhydrique |
| HER 1,2 | Human Epidermal growth factor Receptor 2 / Récepteur 2 pour le facteur de croissance épidermique |
| HRR | Homologous recombination / Recombinaison homologue |
| HSCF | Health Science Centre Foundation |
| hTRF2 | Human Telomeric repeat binding factor 2 / Facteur 2 de liaison aux séquences télomériques répétées |
| IDH1 et 2 | Isocitrate déshydrogénase 1 et 2 |
| IGFR1 | Insulin-like growth factor receptor 1 / Récepteur pour le facteur de croissance similaire à l'insuline |
| IgG2 | Immunoglobuline G2 |
| IGH | Gène de l'immunoglobuline heavy chain complex |
| IGL | Gène de l'immunoglobuline lambda chain complex |
| IGR | Immunoglobuline receptor / Récepteur des immunoglobulines |
| ISIS | In situ Imaging system / Système d'imagerie in situ |
| Iso(17q) | Isochromosome 17q |
| Kb | Kilobase |

| | |
|-----------------|---|
| Ki67 | Antigène marqueur de prolifération |
| KPS | Karnovsky Scale Performance / Index de Karnovsky |
| LAL | Leucémie aiguë lymphoblastique |
| LOH | Loss of Heterozygosity / Perte d'hétérozygotie |
| LSI | Locus Specific Identifier / Identificateur de loci spécifiques |
| m | Période de la mitose du cycle cellulaire |
| MAD1 | Max dimerization protein 1 / Spindle assembly checkpoint component MAD1 / Composante MAD1 du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique. |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase1 / Voie de transduction du signal cellulaire MAPK / ERK |
| Mb | Megabase |
| mBanding | Multicolour Banding / Marquage multicolore |
| MDM2 | Murine double minute gene 2 / Gene 2 double minute murin |
| MDS | Myelodysplastic syndrome / Syndrome myélodysplasique |
| MFISH | Multicolour-FISH / FISH multicolore |
| MGMT | O(6)-méthylguanine-ADN-méthyltransférase |
| MHRC | Manitoba Health Research Council |

| | |
|--------------|--|
| MIN | Microsatellite Instability / Instabilité des microsatellites |
| miRNA | MicroRNA |
| MMAC | Methylmalonic aciduria and homocystinuria type C homolog / Homologue de l'acidurie méthylmalonique et homocystinurie de type C |
| MMP2 | Matrix metalloproteinase 2 / Métalloprotéinase 2 |
| MMP9 | Matrix metalloproteinase 9 / Métalloprotéinase 9 |
| MRI | Magnetic Resonance Imaging / Imagerie par résonance magnétique nucléaire |
| MS | Median Survival / Survie médiane |
| ms | Milliseconde |
| MSP | Ministère de la Santé Publique |
| mTOR | Mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase) / Cible mécanistique de la rapamycine sur la sérine et la thréonine |
| N+Vo | Nausée et vomissements |
| NaCl | Chlorure de sodium |
| NBS | Nijmegen breakage syndrome 1 (nibrin); cell cycle regulatory protein p95 ; p95 protein of the MRE11 meiotic recombination 11 / RAD50 (Radiation repair gene) complex. |

| | |
|---------------------------|--|
| nCIN | Numerical Chromosome Instability / Instabilité chromosomique numérique |
| NHEJ | Non homologous End joining Machinery / Machinerie de liaison non homologue des extrémités |
| NOTCH2 | Notch homolog 2 / Homologue 2 du gène Notch |
| NRG 1-4 | Neurogulin / Neuroguline |
| NSCLC | Non-Small Cell Lung Cancer |
| NSERC | Natural Sciences and Bioengineering Council of Canada |
| Olig 1 et 2 | Oligodendrocyte lineage transcription factor 1 et 2 |
| p | Bras court d'un chromosome |
| P14ARF | Protéine 14 alternate reading frame (ARF) |
| P16 | Protéine 16 |
| P18^{ink4} | Protéine 18 qui inhibe CDK4 |
| P70sk6 | Protéine de choc thermique |
| P95 | Protéine 95 |
| Pb | Paire de bases |
| PBS | Phosphate buffered saline / Tampon phosphate |
| PCR | Polymerase Chain Reaction / Réactions en chaîne à l'aide de la polymérase |
| PDGFR | Platelet derived growth factor receptor / Récepteur pour le facteur de croissance dérivé des plaquettes |

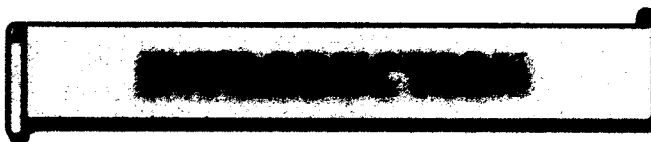
| | |
|------------------|---|
| PDGFRA | Platelet Derived Growth Factor Receptor A / Récepteur de type A pour le facteur de croissance dérivé des plaquettes |
| Phi | Chromosome philadelphie |
| PHLDB1 | Pleckstrin homology-like domain, family B, member 1 / Domaine d'homologie de la pleckstrin, famille B, membre 1 |
| Pi3K | Phosphatidylinositol 3'-kinase |
| PKB | Phosphokinase B |
| PML/LAM 3 | Promyelocytic Leukaemia / Leucémie promyélocytaire ou aiguë myéloïde de type 3 |
| PML/RARA | Gène de fusion entre les gènes : promyelocytic leukemia et le récepteur alpha de l'acide rétinoïque |
| PNA | Peptic nucleic acid / Acide nucléopeptidique |
| POT1 | Protection of Telomere / Protection de télomère |
| PTEN | Phosphatase and TENSin homolog / Homologue de la phosphatase tensine |
| q | Bras long d'un chromosome |
| QFISH | Quantitative FISH / FISH quantitatif |
| r(16) | ring chromosome 16 / Chromosome 16 en anneau |
| r(4) | ring chromosome 4 / Chromosome 4 en anneau |

| | |
|---------------------|---|
| Raf | v-raf1 murine leukemia viral oncogene homolog1/ oncogène homologue de l'oncogène viral v-raf1 de la leucémie murine |
| Rap1 | Repressor Activator Protein / Protéine activatrice de la répression |
| Ras | Protéine Ras / Oncogène Ras |
| Rb1 ou RB1 | Gène du rétinoblastome |
| RI | Radiations ionisantes |
| RMN | Imagerie par résonance magnétique nucléaire |
| RNA | Ribonucleic acid / Acide ribonucléique |
| RNAi | ARN d'interférence |
| RT | Room Temperature / Température de la pièce Reverse Transcriptase – Polymerase Chain |
| RT-PCR | Reaction / Transcriptase inversée suivie de réactions en chaîne à l'aide de la polymérase |
| RTEL1 | Regulator of telomere elongation helicase 1 / Hélicase régulatrice de l'élongation des télomères |
| RTK | Receptor Tyrosine Kinase / Récepteur tyrosine kinase |
| RTOG | Radiation Therapy Oncology Group |
| RUNX1/PRDM16 | Gène de fusion entre les gènes runt-related transcription factor 1 et PR domain containing 16 |

| | |
|---------------|---|
| SAS | Statistical Analysis Software / Logiciel d'analyse statistique |
| sCIN | Structural Chromosome Instability / Instabilité chromosomique de structure |
| SKY | Spectral Karyotyping / Caryotype spectral |
| SSC | Standard saline citrate |
| SSPS | Statistical Package for the Social Sciences / Ensemble statistique pour les sciences sociales |
| STR | Short Tandem Repeat / Courtes répétitions en tandem |
| STUPP | Temozolomide – Radiotherapy / Témazolomide – Radiothérapie |
| t-AML | Therapy-related Acute myeloid leukemia / Leucémie myéloïde aiguë associée aux traitements |
| T-CLL | T-cell chronic lymphoid leukemia / Leucémie lymphoïde chronique à cellules T |
| t-MDS | Therapy-related Myelodysplastic Syndrome / Syndrome myéloblastique associé aux traitements |
| t(2,7) | Translocation entre les chromosomes 2 et 7 |
| TA | Telomere Aggregates / agrégats télomériques |
| Taq | Thermus Aquaticus DNA polymerase / ADN polymérase Thermus Aquaticus |

| | |
|-------------------------------------|---|
| TAR | Telomere Associated region / Région associée aux télomères |
| TEL/AML1 ou ETV6/RUNX1 | Gène de fusion entre ETV6 (TEL) et AML1 (CBFA2 ou RUNX1) |
| TERRA | Telomere Replication containing RNA / Réplication des télomères contenant de l'acide ribonucléique |
| TERT | Telomerase Enzyme Reverse Transcriptase / Sous-unité catalytique de la télomérase |
| TGFα | Tumor Growth factor alpha / Facteur de croissance tumorale alpha |
| TGFβ 1 et 2 | Tumor Growth Factor β 1 et 2 / Facteur Beta 1 et 2 de croissance tumorale |
| TIFF | Tagged Image File Format |
| TIN2 | TERF1 (TRF1)-Interacting Nuclear factor 2 / Membre du complex shelterin |
| TMPRSS2/ETS | Gène de fusion entre les gènes : transmembrane protéase, sérine 2 / un oncogène de la famille ETS |
| TP | Touch preparation / Empreintes cellulaires sur lames |
| TP53/P53 | Gène P53 |

| | |
|-----------------|--|
| TRAP | Telomere Repeat Amplification Protocol / Protocole d'amplification des répétitions télomériques |
| TRF | Telomere Restriction Fragment / Fragment de restriction télomérique |
| TRF1,2 | Telomeric repeat-binding factor 1,2 / Facteur de liaison aux répétitions des télomères. |
| TRITC | Tetramethyl Rhodamine Iso-ThioCyanate |
| TSG | Tumor suppressor gene / Gène suppresseur de tumeurs |
| TTP | Time To Progression / Temps de progression |
| TTP1 | Membre du complexe shelterin |
| UV | Ultra-violet / Rayons ultraviolets |
| VEGFR1,2 | Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 and 2 / Récepteur 1 et 2 du facteur de croissance vasculaire endothéliale. |
| VNDR | Variable Number of Dinucleotide Repeat / Nombre variable de répétitions de dinucléotides |
| WHO | World Health Organization / Organisation mondiale de la santé |
| YAC | Yeast artificial chromosome / Chromosome artificiel de levure |



Introduction

1.1. Généralités sur le cancer

Le cancer est une maladie insidieuse à évolution pernicieuse dans le temps et dans l'espace corporel. La carcinogenèse est un processus en plusieurs étapes qui conduit à une croissance cellulaire clonale incontrôlée dont la résultante est la transformation de cellules normales en cellules malignes. Cependant ce processus de transformation maligne est d'une complexité telle que beaucoup reste encore à comprendre des cancers. Encore aujourd'hui, le cancer continue à tuer des milliers de personnes par année à travers le monde et ce malgré les avancées énormes et significatives de la recherche médicale. Selon l'OMS le cancer touche environ 10 millions de personne par an à travers le monde dont annuellement six millions d'entre elles en meurent (STEWART et KLEIHUES, 2003). Actuellement plus de 22 millions de personnes sont atteintes de cancer à travers le monde (STEWART et KLEIHUES, 2003). Les gliomes qui sont les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes ont une incidence de 5 cas pour 100 000 habitants et leur pic d'incidence se situe entre 50 et 60 ans. Ils constituent les cancers les plus fréquents derrière les leucémies chez l'enfant et représentent la troisième cause de mortalité chez le jeune adulte. Ils représentent 3% de tous les cancers. Le caractère bénin ou malin d'un gliome ne semble pas avoir d'importance car en fonction principalement de leur localisation les gliomes affectent toujours le pronostic de vie.

Au demeurant les progrès énormes en génétique, biologie cellulaire et moléculaire ont permis de mieux cerner et de mieux comprendre les cancers et d'en arriver à traiter efficacement certains.

1.2. Génétique, biologie cellulaire et moléculaire du cancer

La cellule est l'unité structurale et fonctionnelle du corps humain et héberge l'information génétique ou génome. Ce dernier est réparti en 46 chromosomes contenus dans chaque noyau cellulaire (TRASK, 2002). Cet ADN associé à l'ARN et à des protéines (histones) est organisé en sous-ensembles de chromatine. Lors du cycle cellulaire, durant la phase de mitose ou division cellulaire, l'ADN forme les chromosomes qui maintiennent leur unité tout au long de ce cycle à travers des modifications morphologiques et fonctionnelles considérables (BERNHEIM, 2002). Il y'a près d'un siècle que Theodore Boveri (BOVERI, 1902; BOVERI, 1914) a émis l'hypothèse que le cancer serait une maladie génétique (chromosomique) de la cellule (BALMAIN, 2001).

Le développement fulgurant de la génétique et de la génétique moléculaire allant de la cytogénétique à la cytogénomique a permis de confirmer hors de tout doute l'hypothèse de Boveri. En effet, la cellule normale subit une série de modifications de son patrimoine génétique qui l'amène à se diviser indéfiniment sans aucun contrôle devenant ainsi une cellule maligne qui va générer un cancer. Cependant toute nouvelle formation cellulaire ou néoplasme ou tumeur n'est pas maligne. En effet, les tumeurs sont classées en deux catégories : tumeurs bénignes et tumeurs malignes dont la distinction est basée sur leur apparence morphologique et leur

devenir clinique selon quatre critères qui sont : 1) transformation ou différenciation et anaplasie, 2) croissance sélective, 3) invasion locale, 4) métastase. Une tumeur bénigne est bien circonscrite et localisée, différenciée avec des cellules ressemblant à la cellule mère et ne présente jamais de métastases; par opposition une tumeur maligne est moins bien différenciée avec des cellules présentant des changements morphologiques, envahit le tissu environnant (infiltration du parenchyme) et finit par faire des métastases dans les autres parties du corps à l'exception des tumeurs cérébrales primaires pour lesquelles les métastases sont extrêmement rares. Ainsi toute cellule maligne possède :

- une indépendance aux signaux de croissance cellulaire c'est à dire l'activation d'un oncogène,
- une insensibilité aux signaux d'arrêt de la croissance cellulaire, c'est-à-dire l'activation de gènes suppresseurs de tumeurs,
- échappe à l'apoptose ou mort cellulaire programmée par stimulation des facteurs de croissance et de survie,
- est immortelle par sa capacité à se multiplier de façon indéfinie,
- initie l'angiogenèse par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour permettre le développement de la tumeur et enfin
- a la capacité d'envahir le tissu environnant et de faire des métastases conduisant à la dissémination du cancer dans l'organisme.

Les évidences génétiques du cancer découlent de la démonstration de l'implication de différents types de gènes dans le processus cancéreux. Par exemple des gènes qui codent pour :

- des protéines impliquées dans les voies de signalisation qui favorisent la prolifération cellulaire,
- des constituants du cytosquelette impliqués dans le maintien de l'inhibition de contact,
- des régulateurs du cycle mitotique cellulaire
- des protéines de l'apoptose
- des protéines responsables de la détection et de la réparation des dommages à l'ADN.

Il a été établi que différents types de mutations sont à l'origine du cancer que ce soit des mutations qui amènent un gain de fonction d'un allèle d'un proto-oncogène, des mutations qui causent une perte de fonction des deux allèles ou qui produisent un effet dominant négatif d'un allèle d'un gène suppresseur de tumeurs et enfin qui génèrent des translocations chromosomiques qui causent une mauvaise expression de gènes ou créent des gènes chimériques qui codent pour des protéines qui ont de nouvelles propriétés. Durant son évolution le cancer va accumuler d'autres anomalies génétiques à travers des mutations ou des mécanismes épigénétiques qui vont inhiber certains gènes qui codent pour la machinerie cellulaire de réparation des dommages de l'ADN et le maintien de la normalité génétique et cytogénétique

de la cellule. Une dernière évidence du caractère génétique du cancer vient de sa survenue de manière sporadique chez un individu ou de manière répétée chez différents individus dans une même famille.

En résumé les avancées considérables en cytogénétique et génétique moléculaire ont permis d'établir les bases génétiques et moléculaires et les patrons cellulaires conduisant au cancer. Ils ont également permis d'adopter de nouvelles stratégies de traitement et/ou de prévention du cancer qui ont connu et continuent de connaître des succès importants.

1.3. Les gliomes ou tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes

Les causes des gliomes demeurent obscures. À l'exception des radiations ionisantes, aucun facteur environnemental précis n'a été mis en cause de façon absolue dans la survenue des gliomes (DEANGELIS, 2001; INSKIP *et al.*, 2001; WEN et KESARI, 2008). Ces tumeurs peuvent être des astrocytomes ou des oligodendrogliomes ou des oligoastrocytomes. Les astrocytomes sont classés en quatre grades allant de I à IV basé sur l'histologie selon l'OMS (LOUIS *et al.*, 2007). Il s'agit du grade I ou astrocytome pilocyttaire, du grade II ou astrocytome diffus de bas grade, du grade III ou astrocytome anaplasique et enfin du grade IV ou glioblastome (GBM). Les oligodendrogliomes sont eux classés en grade II ou oligodendrogliome et en grade III ou oligodendrogliome anaplasique. Enfin, les tumeurs mixtes (astrocytaires et oligodendrogliales) sont classées en grade II ou oligoastrocytome et en grade III ou oligoastrocytome anaplasique (Figure 1).....

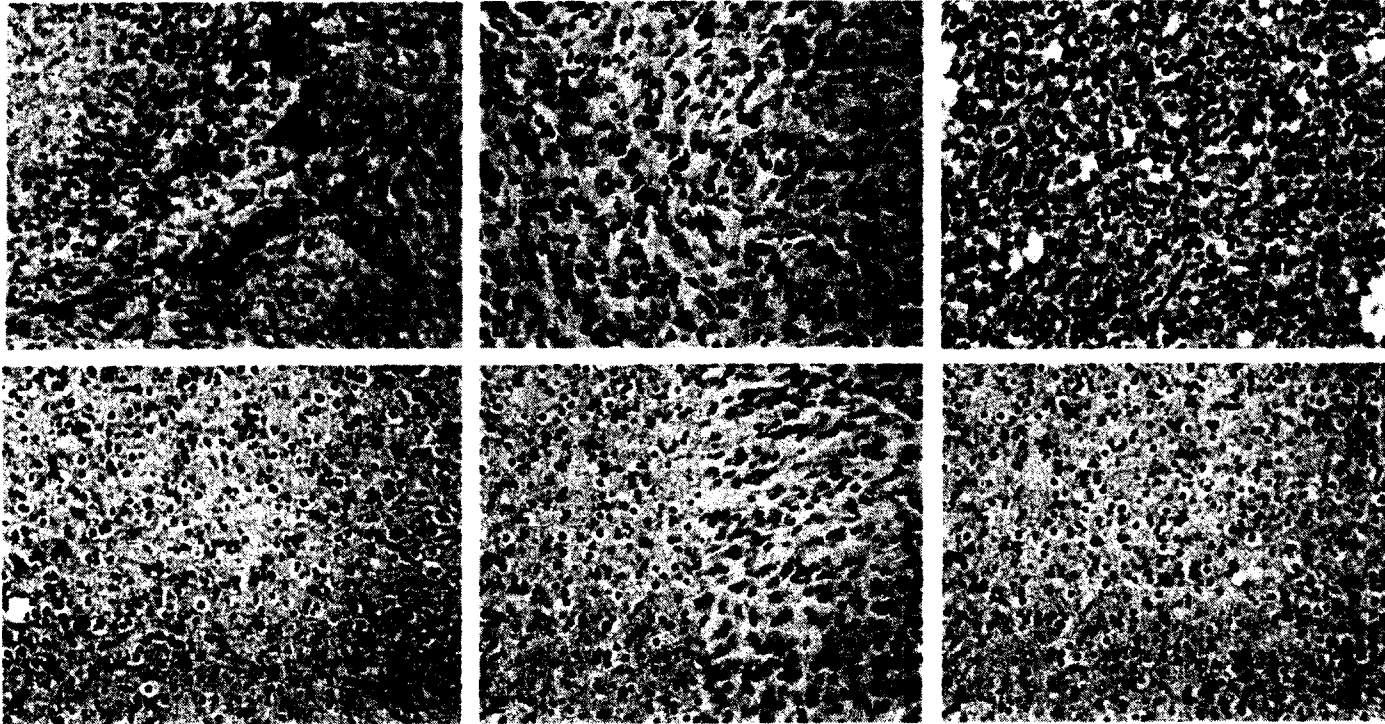


Figure 1 : Présentation histologique des gliomes : a) GBM; b) astrocytome; c) astrocytome anaplasique; d) oligodendrogliome; e) oligoastrocytome avec composante oligodendrogliale à gauche et composante astrocytaire à droite et f) oligodendrogliome anaplasique (coloration hématoxilline & éosine; X 400) (images extraites de la banque de données de notre cohorte de patients)

Les gliomes se développent et restent confinés dans la boîte crânienne. Les métastases en dehors du névraxe sont exceptionnelles. Elles entraînent des signes cliniques en rapport avec la compression du cerveau et l'augmentation de la pression intracrânienne ou hypertension intracrânienne. Ainsi, la symptomatologie clinique est en fonction du siège de la tumeur au sein du cerveau. Les signes cliniques les plus fréquents sont les maux de tête avec nausées, une atteinte physique et psychique, une faiblesse et une difficulté à parler ou une gêne visuelle. La zone du cerveau atteinte entraîne une perturbation du centre de commandement situé dans cette aire. Ces tumeurs peuvent aussi se manifester par des crises convulsives qui peuvent être partielles limitées à des sensations ou à des mouvements involontaires ou généralisées avec perte de connaissance. Le diagnostic clinique requiert des examens complémentaires qui sont la tomographie par ordinateur (CT-scan) et l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (RMN). Le CT-scan utilise des rayons X et les résultats sont traités par ordinateur. Il permet de voir le cerveau en différentes coupes. Il se fait avant et après injection d'iode et permet de voir la tumeur où se concentre le maximum de produit iodé injecté. La RMN permet d'obtenir d'excellentes images du cerveau après injection de produit de contraste comme le gadolinium. Les noyaux vont être soumis à un champ magnétique et les données obtenues traitées par ordinateur (Figure 2).

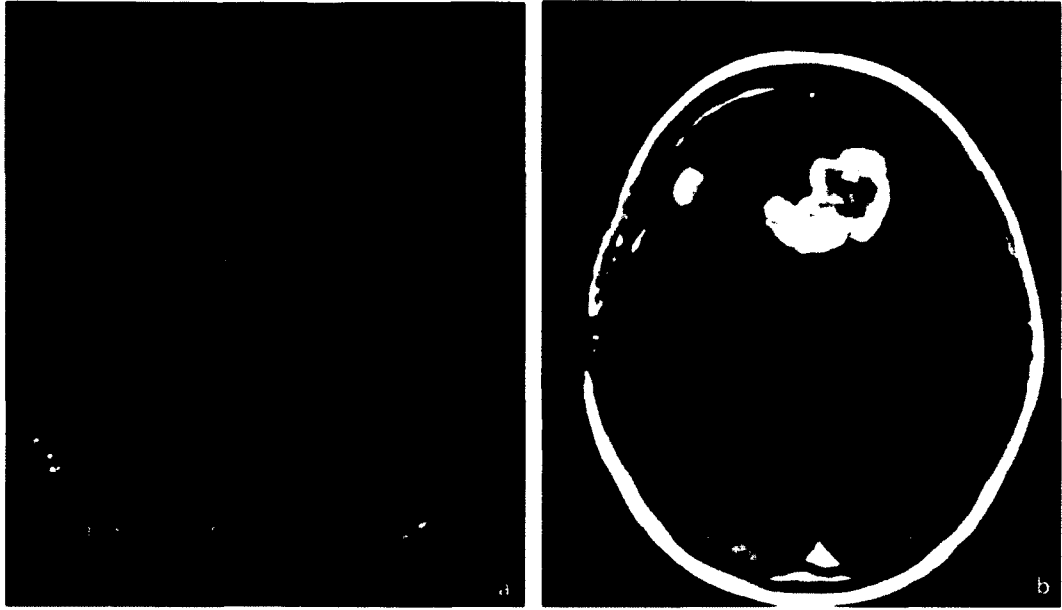


Figure 2 : a) Résonance magnétique en pondération T1 rehaussée de gadolinium, démontrant la présence d'une lésion rehaussante hétérogène, à centre nécrotique, impliquant la région mésiale en temporale droite. À noter l'œdème vasogénique péri-tumoral important. À la pathologie, un diagnostic de glioblastome a été rapporté.

b) Résonance magnétique, pondération T1 rehaussé au gadolinium axiale chez une patiente de 42 ans porteuse d'un oligodendrogliome récidivant. À noter la récurrence tumorale dans la cavité de résection, ainsi que le nodule satellite prenant le genou du corps calleux et traversant dans l'hémisphère gauche (images extraites de la banque de données de notre cohorte de patients).

Cependant le diagnostic pathologique de ces tumeurs reste le « gold standard » qui utilise les techniques histologiques et immunohistochimiques pour poser le diagnostic et classer la tumeur. La classification de l’OMS de ces gliomes repose sur la pathologie (LOUIS *et al.*, 2007). Au demeurant, des insuffisances existent dans le diagnostic pathologique de ces tumeurs dues à la variabilité inter pathologistes et à des critères parfois subjectifs (voir chapitre 1, article 1) surtout en ce qui concernent les oligoastrocytomes. Les complications des gliomes sont essentiellement liées à la biologie de ces cellules qui leur ont donné naissance. Ces cellules ont des propriétés infiltrantes, migratoires et angiogéniques. En effet ces cellules infiltrent le parenchyme normal et peuvent migrer pour se retrouver à distance du site de localisation de la tumeur (EARNEST *et al.*, 1988). La nature infiltrante des astrocytomes diffus a été reconnue dès 1928 par Dandy (DANDY, 1928). Ces cellules ayant une capacité infiltrante et migratoire donnent un caractère diffus à ces tumeurs. De plus ces cellules secrètent des facteurs diffusibles qui activent directement la migration et la prolifération des cellules endothéliales pour former une néo-angiogenèse fonctionnelle qui est une étape essentielle à la progression tumorale (BOUDOURESQUE *et al.*, 2005) (Tableau 1).

Tableau 1 : Les principales protéines impliquées dans la prolifération, la migration et l'angiogenèse des gliomes.

| Protéines | Fonctions |
|------------------|--|
| EGFR et EGFRvIII | Protéines clés de la prolifération tumorale, permettent la sous-classification des GBM |
| VEGFR1 et 2 | Protéines clés de l'angiogenèse, de la migration et de la prolifération tumorales |
| TGFB 1 et 2 | Protéines de l'angiogenèse, de la migration et de la prolifération tumorales |
| MMP2 | Destruction de la matrice extracellulaire pour l'invasion et la migration |
| MMP9 | Destruction de la matrice extracellulaire pour l'invasion et la migration |
| Ki-67 | Impliquée dans la prolifération cellulaire tumorale |
| Tenascine-E | Impliquée dans la prolifération cellulaire tumorale |

Le traitement des tumeurs cérébrales repose sur la chirurgie qui consiste à exciser la grande majorité de la tumeur dans la limite du possible sans endommager les aires normales environnantes du cerveau. Il est évident que la chirurgie ne peut pas extirper toute la tumeur à cause de la nature infiltrante de ces tumeurs d'où la nécessité des traitements adjuvants que sont la radiothérapie et la chimiothérapie. C'est donc la combinaison de la chirurgie, la radiothérapie et/ou la chimiothérapie qui constitue le traitement standard des gliomes. Malgré cet arsenal thérapeutique leur évolution demeure fatale. C'est pourquoi de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur les connaissances de plus en plus approfondies de la biologie de ces tumeurs ont été développées (voir article en annexe). Cette biologie est marquée par une instabilité génétique caractérisée par des anomalies chromosomiques comme nous en retrouvons dans tous les cancers.

1.4. Anomalies chromosomiques et cancer

Dans le contexte de cancer, les anomalies chromosomiques et génomiques sont acquises car généralement elles sont retrouvées uniquement dans les cellules tumorales et non dans les autres cellules non tumorales de la personne.

1.4.1. *Chromosome*

Le séquençage du génome humain terminé, la localisation des gènes sur les chromosomes avance rapidement. Les 46 chromosomes du génome humain sont représentés par leur aspect physique lors de la prométaphase et la métaphase qui sont deux étapes très courtes de la mitose. Un chromosome est donc constitué de deux chromatides sœurs nettement visibles réunies par le centromère et

terminés par les télomères. Le centromère divise ainsi un chromosome en bras court (p) et en bras long (q) et est essentiel lors de la ségrégation des chromosomes durant la division cellulaire. Les télomères ou « coiffes » du bras court et du bras long sont importants pour le maintien de l'intégrité chromosomique, pour la réplication de l'ADN aux extrémités des chromosomes et pour l'établissement de l'architecture en trois dimensions du noyau. On identifie les différents chromosomes par leur aspect morphologique après un marquage en bandes.

1.4.2. Marquage chromosomique

Il a fallu plusieurs dizaines d'années pour établir le nombre exact de chromosomes bien que les premières images des chromosomes humains datent du 19^{ième} siècle (GARTLER, 2006; TRASK, 2002). Quand on est enfin arrivé à établir le nombre exact de chromosomes en 1956 (TJIO et LEVAN, 1956), alors des techniques cytogénétiques fiables ont permis d'identifier des anomalies chromosomiques de nombre comme la trisomie 21 ou syndrome de Down en 1958, des syndromes de Klinefelter et de Turner en 1959 en cytogénétique périnatale. Par contre, en cytogénétique oncologique la découverte la plus excitante a été l'identification en 1960 d'un petit chromosome dénommé plus tard chromosome Philadelphie (Phi) qui était régulièrement observé dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) (BALMAIN, 2001; NOWELL et HUNGERFORD, 1960; NOWELL *et al.*, 1998; ROWLEY, 2001; ROWLEY, 2008).

1.4.3. *Les anomalies chromosomiques*

Le génome évolue primitivement par deux mécanismes : les mutations dans les séquences de l'ADN et les réarrangements chromosomiques (HOLMQUIST et ASHLEY, 2006). Les anomalies chromosomiques peuvent être regroupées en deux grandes entités : les réarrangements chromosomiques et les déséquilibres chromosomiques. À côté de ces anomalies à l'échelle chromosomique, nous avons les anomalies à l'échelle génique appelées mutations et les atteintes des télomères. Les anomalies chromosomiques peuvent être des anomalies de nombre ou de structure. Elles peuvent être équilibrées, c'est à dire sans anomalie quantitative ou déséquilibrées avec des pertes ou des gains de matériel génétique. Certains remaniements chromosomiques peuvent être spécifiques d'une pathologie donnée. Dans ce cas ils participent à la définition de la maladie comme le chromosome Phi dans la LMC mentionnée ci-dessus (BALMAIN, 2001; BERNHEIM, 2002; NOWELL *et al.*, 1998; ROWLEY, 1973; ROWLEY, 2001; ROWLEY, 2008). Ces genres d'anomalies sont pris en compte actuellement dans la classification des tumeurs par l'OMS. D'autres anomalies surviennent secondairement au cours du processus prolifératif comme la trisomie 8 dans les leucémies aiguës myéloblastiques (BALMAIN, 2001; BERNHEIM, 2002; ROWLEY, 1973; ROWLEY, 2001; ROWLEY, 2008). Un autre exemple est la translocation t(1;21)(p36;q22) donnant un gène de fusion *RUNX1/PRDM16* retrouvée dans la LMC avec chromosome Phi et qui contribuerait à la transformation de cette LMC en LAM (HAZOURLI *et al.*, 2006). Il existe également des anomalies qui n'ont pas de signification réelle lorsque prises isolément. Par contre, si on les met ensemble, elles

permettent le diagnostic comme un iso(17q) et des anomalies du 1q retrouvées dans la tumeur cérébrale de l'enfant ou medulloblastome (BERNHEIM, 2002). Ces avancées significatives ont révolutionné le monde de la génétique oncologique et ont été possibles grâce au développement fulgurant de techniques efficaces et reproductibles. Ces dernières vont de la cytogénétique classique qui permettait l'étude morphologique en bandes des chromosomes, à la cytogénétique moléculaire avec l'hybridation *in situ* observée en fluorescence utilisant des sondes moléculaires, et enfin à la cytogénomique basé sur l'hybridation génomique comparative sur chromosomes ou sur micromatrice de dépôts d'ADN abolissant ainsi les frontières entre ces différentes disciplines (SPEICHER et CARTER, 2005).

1.4.4. Techniques de mise en évidence des anomalies chromosomiques et génomiques

L'évolution des techniques de cytogénétique a été surtout marquée par l'augmentation de la résolution à laquelle les réarrangements chromosomiques peuvent être détectés. Cette augmentation de la résolution a été possible au niveau de la cible (les chromosomes) et au niveau des sondes (SPEICHER et CARTER, 2005). La résolution de l'analyse chromosomique a été améliorée par la possibilité:

- de préparer les chromosomes en prométaphase étalés à la résolution de ~3 à 5 Mb par bande

- d'analyser les noyaux interphasiques à la résolution de 50 kb à 2 Mb

- et d'obtenir des fibres de chromatine à la résolution de 5 kb à 500 kb (SPEICHER et CARTER, 2005). Par contre la résolution avec les sondes a été améliorée avec la mise au point des micromatrices et a même atteint une résolution plus grande à l'échelle du simple nucléotide. Le marquage des sondes a été aussi largement amélioré passant du marquage radioactif au marquage en fluorescence.

1.4.4.1. Culture cellulaire et marquage chromosomique

Pour obtenir les chromosomes et établir un caryotype, il a fallu d'abord réussir à cultiver les cellules et à les récolter pour pouvoir étaler les métaphases sur une lame en vue de les marquer. C'est avec l'utilisation des fluorochromes couplés à des agents alcalins comme la moutarde de quinacrine qui produit un patron de bandes fluorescentes caractéristiques qu'un caryotype complet a été enfin obtenu par Caspersson en 1970 (CASPERSSON *et al.*, 1970). Dans la même année, le marquage après coloration au Giemsa remplaça très rapidement le marquage à la quinacrine. Ce fait et l'amélioration de la résolution (taille) de l'analyse des chromosomes montra en 1973 que les chromosomes Phi n'était pas une délétion du chromosome 22 mais une translocation entre les chromosomes 9 et 22 (NOWELL *et al.*, 1998; ROWLEY, 1973). Cela a marqué le début d'une grande variété de découvertes d'anomalies chromosomiques dans les cancers.

1.4.4.2. Hybridation *in situ* observée en fluorescence ou FISH

La technique FISH requiert des sondes d'ADN spécifiques à la séquence d'ADN d'intérêt (BAUMAN *et al.*, 1980; GALL et PARDUE, 1969; PARDUE et GALL, 1969; RUDKIN et STOLLAR, 1977). Ces sondes peuvent être bicaténaires

(« doubles brins ») ou monocaténares (« simples brins »), marquées ou non marquées. Ensuite on dénature l'ADN nucléaire de la cellule, c'est-à-dire on sépare les deux brins d'ADN et on en fait autant avec les sondes bicaténares. On réassocie ADN-ADN, soit la sonde avec son complément chromosomique qui peut être mise en évidence *in situ* à toutes les étapes du cycle cellulaire. Le marquage chimique des sondes permet une détection par fluorescence. Le marquage le plus classique utilise trois couleurs simultanément, deux couleurs pour les deux sondes et une couleur pour la contre-coloration. Par exemple, on marque une sonde avec un fluorochrome qui fluoresce en vert et une autre sonde avec un fluorochrome rouge et on contre-colore le noyau en bleu (voir chapitre 1 article 1). Actuellement cinq fluorochromes classiques sont les plus utilisés pour marquer simultanément les sondes qui sont disponibles commercialement (voir chapitre 1 article 2). Les différentes combinaisons de ces fluorochromes permettent de marquer chaque chromosome d'une couleur unique (voir paragraphe 1.4.4.4). On peut aussi commander une séquence qui servira de sonde, une séquence intégrée dans un BAC, tout le génome humain est disponible dans des BAC qui peuvent être commandés par internet. La technique FISH d'une grande fiabilité est utilisée de routine dans les laboratoires de génétique clinique. La technique FISH est applicable sur noyaux cellulaires en interphase, sur chromosomes métaphasiques et sur des coupes de tissus en paraffine de matériel archivé. Elle permet par exemple de détecter l'amplification génique du gène *ERBB2/HER2* dans le cancer du sein et du chromosome Phi sur noyaux interphasiques.

1.4.4.3. Les différents types de sondes

- les sondes de séquences répétées :

Elles permettent la reconnaissance de motifs répétés en tandem. Ces motifs peuvent correspondre :

- à des séquences alphasatellites communes à tous les centromères. Ce sont des motifs de 171 pb répétés en tandem dont la taille approximative est de 3 Mb;
- à des séquences β -satellites localisées dans la région péracentromérique des chromosomes 1, 9 et Y et sur les bras courts des chromosomes acrocentriques;
- aux séquences satellites II ou *classical satellite*, qui sont de courts motifs répétés de type (AATGG)_n. Elles sont spécifiques de l'hétérochromatine des chromosomes 1, 9, 15, 16 et de l'hétérochromatine du bras long du chromosome Y.
- à des télomères qui sont des séquences (TTAGGG) répétées plusieurs fois (voir paragraphe 1.6.), communs à tous les chromosomes.
- aux séquences répétées associées aux télomères (TAR) qui sont des séquences répétées en bloc de 30 à 40 pb associées aux télomères. Chaque type de TAR est spécifique d'un ou de quelques chromosomes.

- Les sondes à séquences uniques :

Elles ont une taille de 0.5 kb à 1 ou 2 Mb et correspondent à des séquences spécifiques d'une bande chromosomique ou d'un locus. Elles sont clonées dans des

vecteurs de types phage, plasmide, cosmide ou YAC (*yeast artificial chromosome* ou chromosome artificiel de levure).

- Les sondes de peinture chromosomique

Elles permettent de reconnaître un chromosome entier. Elles sont constituées d'un ensemble de sondes de petite taille. Elles sont obtenues après isolement et marquage de l'ADN d'un chromosome. Il existe également des peintures spécifiques d'un bras ou même de quelques bandes chromosomiques. On peut ainsi avec la technique « mBand » reconnaître les différentes bandes d'un chromosome avec des sondes de couleur différente spécifiques à chaque bande.

- Les sondes PNA (*Peptide nucleic acids*)

Elles sont formées par des molécules synthétiques analogues des acides nucléiques dans lesquelles le squelette phosphatidique est remplacé par une chaîne pseudopeptidique sur laquelle les bases puriques et pyrimidiques sont fixées par des liaisons carboxyliques (NIELSEN *et al.*, 1991; PELLESTOR *et al.*, 2005). Ces sondes sont d'une très grande stabilité. Ce sont les sondes les plus utilisées pour hybrider et mesurer les télomères (LIN et YAN, 2005). Ce sont également ces sondes qu'on utilise pour l'analyse des télomères en trois dimensions (voir chapitre 2, article 1).

1.4.4.4. Les techniques multicolore ou MFISH (multi-FISH) et SKY (Spectral Karyotyping)

Ces techniques sont dérivées de la technique FISH et ont été découvertes simultanément (SCHROCK *et al.*, 1996; SPEICHER *et al.*, 1996). Elles utilisent ces cinq fluorochromes mentionnés ci-dessus pour générer 24 couleurs différentes dans le spectre du visible qui permettent d'identifier chaque chromosome avec une couleur spécifique (voir chapitre 1 article 2). Les microscopes à fluorescence sont couplés à un système d'imagerie informatisée qui permette la lecture, la capture et l'analyse de ces images.

1.4.4.5. Hybridation génomique comparative (CGH)

- sur chromosome

Elle a été décrite initialement par Kallioniemi en 1992 (KALLIONIEMI *et al.*, 1992) et elle permet de quantifier l'ADN tumoral le long des chromosomes au cours de la même analyse, ce qui correspond à un « copy number karyotype ». On marque de l'ADN tumoral, l'ADN test, purifié avec un fluorochrome par exemple la fluorescéine qui émet dans le vert et on marque de l'ADN normal, l'ADN contrôle, avec un autre fluorochrome par exemple la rhodamine qui émet dans le rouge. Les deux ADN sont mélangés de façon équimoléculaire et hybridés sur des chromosomes humains comme dans la technique FISH. Les séquences uniques des chromosomes seront simultanément la cible de l'ADN tumoral et de l'ADN normal (témoin). La mesure se fait grâce à un système d'imagerie numérisée capable de mesurer tout le long des chromosomes le rapport de la fluorescence verte sur la

fluorescence rouge. Une région chromosomique sans anomalie quantitative dans l'ADN tumoral apparaîtra en ocre, une perte chromosomique sera révélée par une couleur rouge et inversement un gain chromosomique apparaîtra en vert. L'amplification d'une région chromosomique sera visible par une intense coloration verte. Cette technique est extrêmement utile pour rechercher des anomalies génomiques surtout quand l'obtention de métaphases de la tumeur s'avère impossible. Ce qui est généralement le cas avec les tumeurs solides comme les gliomes. En fait par cette technique on peut considérer les chromosomes comme une macromatrice par opposition à une micromatrice.

- sur micromatrice

Cette technique repose sur le même principe que la méthode sur chromosome mais ici le support est une micromatrice d'ADN, c'est-à-dire les puces à ADN. Leur résolution augmente de plus en plus et à partir des BAC de 100 à 150 kb, nous sommes actuellement à l'ADNc et aux oligonucleotides de 35 mères. Différentes sortes de puces pangénomiques ou spécifiques de tumeurs sont commercialisées actuellement avec différentes compagnies et avec des résolutions différentes.

Micropuce d'expression

Basé sur le même principe que les micromatrices, cette technique permet d'analyser le niveau d'expression des gènes au sein de la tumeur. Il faut juste transformer les ARNm en cDNA au préalable avant de les hybrider sur la micropuce. Le couplage des deux techniques (micropuce et expression) pour étudier une tumeur permet de

mettre en évidence l'implication des gènes dans la tumorigenèse et de dégager par conséquent de nouvelles cibles thérapeutiques

LOH ou perte d'hétérozygotie

La LOH ou perte d'hétérozygotie est basée sur le modèle de Knudson des deux « hits » ou évènements (NOWELL *et al.*, 1998). Suivant ce modèle, pour qu'un gène suppresseur de tumeurs soit inactivé, il faut la survenue de ces deux évènements : premièrement, une mutation ou premier évènement, donnant un état hétérozygote pour le gène suppresseur de tumeurs avec un allèle normal et un allèle muté; secondairement va survenir un deuxième évènement qui va aboutir à la perte de l'allèle normal. La résultante est alors une perte d'hétérozygotie qui peut survenir sur différentes régions du chromosome. Cette technique se fait avec les microsatellites qui sont des répétitions en tandem et où le motif de base est très court et ne dépasse pas quelques nucléotides. C'est pourquoi, on les appelle aussi STR (*Short Tandem Repeats*) ou VNDR (*Variable Number of Dinucleotide Repeats*). Leur nombre varie de 1 à 4. Le nombre de répétitions ne dépasse pas une quarantaine et la limite inférieure de répétitions est autour d'une douzaine. En dessous de ce chiffre, le microsatellite cesse d'être informatif et les allèles ne peuvent plus être distingués. Les microsatellites les plus utilisés sont de type (CA)_n/(GT)_n car ils sont remarquablement abondants (35 000 à 130 000 sur l'ensemble du génome humain) et sont uniformément distribués; ce qui représente un exemplaire à tous les 25 à 100 Kb. Ils sont très polymorphes et leur informativité est élevée. Le mécanisme généralement admis pour expliquer leur grande variabilité individuelle est l'erreur par dérapage intra-chromatidien (*Strand Slippage*) au

moment de la réplication. Cette technique peut être utilisée avec des marqueurs microsatellites pour étudier les tumeurs. Il s'agit d'amplifier de l'ADN tumoral et de l'ADN constitutionnel du sujet pour chaque microsatellite choisi. Ensuite on compare les allèles de chaque microsatellite de l'ADN tumoral avec ceux correspondant dans l'ADN constitutionnel. L'absence d'un allèle d'un microsatellite dans l'ADN tumoral comparativement à l'ADN constitutionnel traduit une LOH pour ce locus.

Nous venons de passer en revue les principales techniques utilisées et leurs intérêts pour étudier des tumeurs dont les gliomes (Tableau 2). Alors quelles sont les anomalies génétiques retrouvées à ce jour dans les gliomes?

Tableau 2 : Principales techniques et les anomalies détectées

| | | | | | |
|---------------|---|-------------------------------------|-----------------------|--|---|
| Polyploidie | Variation du nombre de copies d'un gène | | Caryotype multicolore | Caryotype du nombre de copies à l'échelle génomique et à très haute résolution | Mise en évidence d'une perte d'un ou des deux allèles d'un gène |
| Aneuploïdie | | | | | |
| Translocation | Translocation | Mesure les télomères en 2D et en 3D | Polyploïdie | | |
| Amplification | Délétion | | Aneuploïdie | | |
| Délétion | Insertion | | Translocation | | |
| Insertion | Amplification | | Amplification | | |
| | Aneuploïdie | | | | |

1.5. Cytogénétique et cytogénomique des gliomes

Les causes génétiques des gliomes ne sont pas encore complètement élucidées. Le principe général de la survenue du cancer est applicable à savoir une cellule normale (ici astrocytes et/ou oligodendrocytes ou une cellule souche ou une cellule précurseure) subit des altérations génétiques entraînant sa prolifération incontrôlée. Cependant les connaissances génétiques et moléculaires de ces tumeurs ne cessent d'augmenter et ont eu un impact considérable dans la prise en charge clinique des patients qui présentent un gliome.

1.5.1. Cytogénétique et cytogénomique des oligodendrogliomes et des oligoastrocytomes

Plusieurs investigations antérieures par la cytogénétique conventionnelle (établissement de caryotypes) décrites ci-dessus ont été menées pour caractériser les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes. D'une façon générale, le caryotype des oligodendrogliomes est normal avec quelques fois la perte d'un chromosome sexuel. Les anomalies chromosomiques les plus fréquentes notées dans les oligodendrogliomes sont un gain du chromosome 7 ou du bras long du chromosome 7 ou des réarrangements structuraux du chromosome 7 (IDBAIH *et al.*, 2009). D'autres anomalies comme la délétion du bras court du chromosome 1, une monosomie 10 ou des délétions à 10q23 ou 10p13, des altérations du 9p et une monosomie du chromosome 22 ou délétion du 22q13 ont été aussi observées (GRIFFIN *et al.*, 1992; JENKINS *et al.*, 1989; RANSOM *et al.*, 1992; REY *et al.*, 1987; THIEL *et al.*, 1992; YAMADA *et al.*, 1994). Dans les oligodendrogliomes anaplasiques (grade III), on note plus une perte d'un chromosome sexuel, des anomalies du chromosome 22 qui sont des monosomies ou des délétions du 22q11 ou 22q13. De plus on peut noter comme dans les oligodendrogliomes un gain du chromosome 7 et des réarrangements structuraux du 1p, 7q, 9p, 13q et 19q (GRIFFIN *et al.*, 1992; JENKINS *et al.*, 1989; RANSOM *et al.*, 1992; THIEL *et al.*, 1992; YAMADA *et al.*, 1994). Les études moléculaires qui utilisent des techniques mentionnées ci-dessus ont permis de dégager trois profils dans les oligodendrogliomes (HOANG-XUAN *et al.*, 2005) à savoir :

- une première entité qui se caractérise par la présence de la délétion combinée de 1p/19q et qui représenterait les oligodendrogliomes purs.
- une deuxième entité qui présente des altérations moléculaires fréquemment retrouvées dans l'évolution des tumeurs astrocytaires de type diffus comme les délétions homozygotes de *P16/CDKN2A*, l'amplification de *EGFR* et la perte du chromosome 10. Ces cas représenteraient des oligodendrogliomes infiltrants et plus agressifs avec des aspects moins typiques.
- une dernière entité combine les deux premières et correspondrait aux glioblastomes avec une composante oligodendrogliale ou GBMO. Ces GBMO présentent des plages de nécroses avec pseudopallissades, prolifération microvasculaire avec d'authentiques zones de différenciation oligodendrogliale. Ces tumeurs évoluent cliniquement comme des glioblastomes et sont considérés comme telles.

Dans les oligoastrocytomes, les caryotypes sont plutôt normaux et des pertes au hasard sont notées comme la perte du chromosome sexuel, monosomie ou réarrangements structuraux du 22q13, des délétions du 1p et des réarrangements du chromosome 7 (GRIFFIN *et al.*, 1992; JENKINS *et al.*, 1989; RANSOM *et al.*, 1992; REY *et al.*, 1987).

En résumé, les tumeurs cérébrales avec une composante oligodendrogliale montrent un caryotype normal ou à la rigueur une perte d'un chromosome sexuel ou 45,X. Les principales anomalies récurrentes sont un gain du chromosome 7 ou un réarrangement du chromosome 7q et une monosomie ou délétion du 22q13. La

principale difficulté d'établissement du caryotype de ces tumeurs est la réussite d'une bonne culture cellulaire. En effet ces cellules sont relativement difficiles à cultiver et se contaminent facilement. Au demeurant, la principale anomalie chromosomique des oligodendrogliomes purs ou mixtes est la délétion combinée 1p et 19q qui confère une bonne réponse à la chimiothérapie (voir chapitre 1, article 1). Le diagnostic histologique des oligoastrocytomes pose beaucoup de difficultés en raison de leur caractère mixte avec une composante astrocytaire et une composante oligodendrogliale qui sont souvent entremêlées (Figure 1). Le profil moléculaire dépend de la proportion entre les deux composantes. Il se rapprocherait soit de celui des astrocytomes, soit de celui des oligodendrogliomes.

1.5.2. Cytogénétique et cytogénomique des astrocytomes

Plusieurs anomalies chromosomiques ont été répertoriées dans les gliomes (BAYANI *et al.*, 2005; IDBAIH *et al.*, 2009) comme :

- dans les astrocytomes : un gain du bras long du chromosome 7 (7q) (SCHROCK *et al.*, 1996), une amplification du bras long du chromosome 8 (8q) (NISHIZAKI *et al.*, 2002), à des fréquences variables des pertes d'hétérozygotie (LOH) sur le bras court du chromosome 10 (10p) et sur le bras long du chromosome 22 (22q) et enfin des délétions du chromosome 6 (MIYAKAWA *et al.*, 2000).
- dans les astrocytomes de grade III : une LOH sur le 10q, 19q et 22q et des délétions du chromosome 6 (FUJISAWA *et al.*, 1999; JAMES *et al.*, 1988).

- dans les GBM : une LOH sur le 17p et le 19q (FUJISAWA *et al.*, 1999), une perte du chromosome 10 dans les GBM primaires et du 10q dans les GBM secondaires (FULTS et PEDONE, 1993).

Les altérations moléculaires les plus importantes décrites dans les astrocytomes sont l'amplification (associé dans 50% des cas à un réarrangement génique) du proto-oncogène *EGFR* et des mutations du gène *TP53* et/ou accumulation de la protéine p53. Ces deux altérations sont exceptionnellement présentes en même temps dans une tumeur astrocytaire. D'autres altérations sont aussi rapportées à savoir des délétions homozygotes du gène suppresseur *P16/CDKN2A* (UEKI *et al.*, 1996), des mutations ponctuelles de *RB1* et *PTEN/MMAC* (ZHOU *et al.*, 1999), des méthylations de la région promotrice de *P14ARF* (NAKAMURA *et al.*, 2001), une amplification des proto-oncogènes *PDGFRA* (FLEMING *et al.*, 1992), *CDK4* (SCHMIDT *et al.*, 2002) et *MDM2* (NEWCOMB *et al.*, 1998; REIFENBERGER *et al.*, 1993). En résumé, ce sont des voies fonctionnelles précises qui sont ciblées : la voie *EGFR/PTEN/PI3K/Akt/P70sk6* et les voies *TP53/MDM2/P14ARF* et *P16/RB/CDK4* (HOANG-XUAN *et al.*, 2005). Il y a une exclusion mutuelle des altérations portant sur chacun des acteurs au sein d'une même voie fonctionnelle (HOANG-XUAN *et al.*, 2005). Ainsi, les délétions *P16*, les mutations de *RB1* et l'amplification de *CDK4* ne sont jamais retrouvées associées dans une même tumeur, toutes trois aboutissant aux mêmes conséquences fonctionnelles (ICHIMURA *et al.*, 1996; UEKI *et al.*, 1996).

Cependant les anomalies chromosomiques de nombre ou de structure et les altérations géniques ne sont pas les seules anomalies génétiques retrouvées dans les

gliomes. En effet, l'érosion des télomères peut entraîner aussi des anomalies génétiques.

1.6. Télomères et leur régulation dans les gliomes

Comme déjà défini ci-dessus, les télomères ont été décrits pour la première fois par Hermann Muller en 1930 (O'CONNOR, 2008). Il leur donna leur nom dérivé du grec étymologiquement (« telo » qui veut dire « fin » et « mere » qui veut dire « part ») basé sur leur position sur le chromosome. En faisant par la suite des expériences de mutagenèse sur la drosophile avec des rayons-X, il réussit à générer plusieurs mutations qui impliquaient des cassures et des fusions de chromosomes. Cependant durant ses expériences, il nota que les extrémités des chromosomes donc les télomères étaient particulièrement résistantes aux rayons-X. Il en conclût que les extrémités des chromosomes contenaient un gène dont la fonction est de sceller le bout du chromosome et que par conséquent un chromosome ne pouvait persister indéfiniment sans avoir ses extrémités scellées. Il n'avait que partiellement raison du fait que les télomères ne contiennent pas de gènes actifs mais jouent un rôle essentiel dans la stabilisation des extrémités chromosomiques (MCKNIGHT et SHIPPEN, 2004). Cependant ce sont les travaux sur le maïs de Barbara McClintock qui obtiendra plus tard le Prix Nobel qui viendront prouver le rôle de protection des extrémités des chromosomes par les télomères (McCLINTOCK, 1941a; McCLINTOCK, 1941b).

1.6.1. Structure des télomères

Il est établi que les télomères sont constitués de répétitions en tandem de séquences courtes riches en GT dans la plupart des cellules eucaryotes (de LANGE, 2004; VEGA *et al.*, 2003). En général, les télomères sont des séquences de 6 à 8 paires de bases qui sont répétées des centaines voire des milliers de fois. Chez l'humain, les télomères ont des tailles de 2 à 50 kilobases et sont constitués approximativement de 300 à 8 000 répétitions précises de la séquence « CCCTAA/TTAGGG » et de protéines spécifiques qui forment ensemble une structure unique à la terminaison des chromosomes humains. Par contre les télomères de *Saccharomyces cerevisiae* contiennent 60 à 100 copies de la séquence « C₁₋₃A/TG₁₋₃ ». Au demeurant, la caractéristique commune de tous les télomères est l'orientation de la chaîne riche en G qui forme l'extrémité 3' du chromosome et la portion terminale de cette chaîne riche en G est monocaténaire générant ce qui est appelé « la queue G ». La longueur de cette queue est quelque peu variable avoisinant 75 à 300 nucléotides chez l'humain et 50 à 100 nucléotides chez la levure. Cette queue monocaténaire va se replier sur elle-même pour former une boucle appelée la « boucle T » visualisée pour la première fois par la microscopie électronique (GRIFFITH *et al.*, 1999). Les télomères sont coiffés par un complexe protéinique appelé « shelterin » (de LANGE, 2005). Ce complexe est composé de 6 protéines avec des fonctions importantes dans la stabilisation et la protection des télomères (Tableau 3).

Tableau 3 : Les protéines du complexe shelterin et leurs fonctions

| Protéines | Fonctions |
|--------------------|---|
| TRF1 et TRF2 | Se lient sur les répétitions télomériques et régulent négativement la longueur des télomères. Elles ont un rôle possible dans la structure des télomères et leur liaison à la matrice nucléaire |
| POT1 | Protéine de liaison spécifique aux répétitions télomériques (reconnait le TTAGGG) |
| TIN2, TPP1 et Rap1 | Rejoignent les 3 sous-unités (TRF1, TRF2 et POT1) pour former le complexe shelterin qui permet aux cellules de distinguer les télomères avec les sites de dommages à l'ADN |

1.6.2. Les protéines télomériques ou le complexe « shelterin » et rôle des télomères

Les télomères sont enveloppés par ce complexe protéique pour éviter la formation de fusion terminale entre les télomères, la dégradation de l'extrémité des chromosomes et la formation de cycles fusions – pontages – cassures. Une mutation sur les gènes qui encodent ces protéines entraînent un certain nombre de maladies génétiques caractérisées par une instabilité génétique et/ou chromosomique et une prédisposition aux cancers (BATISTA et ARTANDI, 2009). Ainsi dans les cancers

une autre voie de destruction des télomères existe sans qu'il y ait leur raccourcissement à savoir l'altération d'une des protéines du complexe « shelterin » donnant lieu à des télomères non coiffés donc non protégés. Par exemple la perte de hTRF2 qui se lie à la double hélice d'ADN entraîne des télomères décoiffés et la ligation des extrémités chromosomiques (BATISTA et ARTANDI, 2009). Dans la plupart des cellules somatiques, les télomères agissent comme une horloge biologique qui limite le nombre de division cellulaire. Si une cellule arrive à contourner ce premier point de contrôle par inactivation du gène *TP53* ou du gène *RBI*, comme par exemple dans quelques astrocytomes, elle va se diviser davantage avec comme conséquence une érosion extensive des télomères. Ces télomères érodés vont perdre leur fonction de protection des chromosomes entraînant la formation de fusions chromosomiques ou non, des cycles de cassures – pontages – fusions, des déséquilibres dans le nombre de chromosomes, des amplifications de gènes et finalement à des translocations chromosomiques non réciproques. La résultante de toutes ces différentes anomalies est la survenue d'une instabilité génétique qui constitue la caractéristique principale de toutes les tumeurs solides y compris les gliomes, en particulier les GBM (CESARE *et al.*, 2009; DESMAZE *et al.*, 2003; GOLLIN, 2007; KUTTLER et MAI, 2007).

1.6.3. Télomère : réplication, télomérase et allongement alternatif des télomères

Les cellules cancéreuses pour échapper au raccourcissement des télomères et à la sénescence, réactivent la télomérase dans 85% des cancers. La télomérase est un complexe enzymatique qui maintient et allonge les télomères. Cette enzyme découverte par Elisabeth Blackburn et Carol Greiger qui leur a valu de devenir

lauréates du Prix Nobel 2009 de Médecine et Physiologie avec Jack W. Szostak, contient une matrice d'ARN incluant une séquence qui est complémentaire à l'unité répétitive des télomères chez le même organisme par exemple TTAGGG chez l'humain (GREIDER et BLACKBURN, 1985). Cette matrice d'ARN est utilisée par la télomérase pour synthétiser de l'ADN au site télomérique. En effet, la télomérase se lie à la queue G du télomère à travers sa matrice d'ARN pour commencer alors à synthétiser une extension de la queue G de manière cyclique par répétition de l'unité répétitive télomérique. La télomérase est capable de répéter ce cycle plusieurs fois en se déplaçant le long des nouvelles queues synthétisées et se fixer sur un nouveau site. Ceci va permettre à l'ADN polymérase et aux enzymes de réparation d'attacher les autres chaînes d'ADN dans le prochain tour de réplication de l'ADN. Les cellules tumorales des autres cancers (15% environ) utilisent une autre voie pour maintenir et allonger leurs télomères en l'absence de toute activité télomérasique. C'est la voie ALT ou « alternative lengthening of telomeres » qui est caractérisée par une augmentation de la recombinaison au niveau des télomères (BECHTER *et al.*, 2003; BOLZAN et BIANCHI, 2006), des télomères de tailles hétérogènes (3 à 50 kb) (BRYAN et REDDEL, 1994), des structures APB « ALT-associated Promyelocytic leukemia Bodies » qui cohabitent avec les télomères (MUNTONI et REDDEL, 2005), de rapides délétions et/ou d'élongations des télomères (BOLLMANN, 2007). Connaissant comment la longueur des télomères est maintenue et comment le problème de sa réplication est résolu, alors il est pertinent de penser à leur possible transcription ou non.

Pendant longtemps, on pensait que les télomères n'étaient pas transcrits. Récemment, il a été montré que les télomères sont transcrits en TERRA « Telomere Repeat-Containing RNA » ou ARN contenant des répétitions télomériques). Ces ARN sont liés aux protéines télomériques indiquant ainsi que TERRA fait parti du complexe « shelterin ».

Les télomères peuvent se positionner en périphérie ou en position interne dans les noyaux selon les types cellulaires. Ils sont en fait de très bons indicateurs de l'architecture nucléaire des noyaux et par conséquent des territoires chromosomiques.

1.7. Architecture nucléaire en trois dimensions et territoires chromosomiques

Les chromosomes se dispersent dans le noyau durant l'interphase ou période entre deux divisions cellulaires et occupent des positions précises qui divisent le noyau en territoires chromosomiques. À l'origine deux modèles d'organisation des chromosomes à l'intérieur du noyau ont été proposés (MISTELI, 2008) à savoir:

- Le premier modèle ou « modèle du territoire chromosomique », proposé par Carl Tabl en 1885 (CREMER *et al.*, 1982), stipule que l'ADN de chaque chromosome occupe un volume défini dans le noyau et ne se superpose ou ne touche que ces voisins immédiats.
- Le deuxième modèle dénommé « modèle spaghetti » stipule que les fibres d'ADN se serpentent largement au hasard dans le noyau et donc les chromosomes sont amalgamés et enchevêtrés les uns avec les autres.

C'est seulement vers les années 1980 que Thomas Cremer et son frère Christophe Cremer (CREMER et CREMER, 2001) réalisèrent des expériences qui allaient élucider ce phénomène. Ils induisirent des dommages à l'ADN à l'aide d'un laser et laissèrent les cellules réparer ces dommages en présence de nucléotides marqués avec la radioactivité pour que les cellules les incorporent. Ils analysèrent alors les régions marquées par radiographie après la division cellulaire suivante et après que les chromosomes soient dans un état condensé. Ils remarquèrent que très peu de chromosomes étaient endommagés supportant ainsi le modèle de territoire chromosomique. En effet, si le modèle spaghetti était vrai, beaucoup de chromosomes seraient endommagés.

Enfin, l'avènement de la technique FISH décrite plus haut viendra définitivement clarifier le modèle de territoire chromosomique. Elle a permis de savoir que les territoires chromosomiques sont de formes irrégulières, constitués en de tout petits sous-domaines et mesurant 1 à 2 micromètres de diamètre. Ces territoires chromosomiques existent chez tous les eucaryotes supérieurs et sont frontaliers très étroitement les uns avec les autres. En fait, des chromosomes voisins peuvent s'enchevêtrer à leur périphérie. De plus, les territoires chromosomiques sont semi conservés de la cellule mère à la cellule fille lors de la division cellulaire avec des localisations chez les cellules filles identiques à celles de la cellule mère (PARADA *et al.*, 2003; PARADA *et al.*, 2004; PARADA *et al.*, 2002). Il est également connu que le patron d'arrangement chromosomique est spécifique au type de cellule et au type de tissu.

L'organisation des chromosomes dans le noyau est un processus hautement organisé. En effet dans les lymphocytes de la souris, le chromosome 12 est souvent à côté du chromosome 14 qui à son tour est adjacent au chromosome 15 formant ainsi un triplet.

La position des gènes dans ces territoires semble importante pour leur expression (BERNHEIM, 2002). En effet, un gène inactif sera en position interne tandis qu'un gène actif sera en périphérie voire à l'extérieure du territoire. Ainsi, les chromosomes riches en gènes comme le chromosome 19 semble se placer en position interne alors que ceux pauvres en gènes comme le chromosome 18 sont à la périphérie du noyau (CROFT *et al.*, 1999) formant une possible protection contre les agressions mutagènes.

Les territoires chromosomiques peuvent être repositionnés en cas de maladie, donnant un possible mécanisme de survenue de la maladie et les raisons qui font que les gènes sont incorrectement exprimés dans la maladie. Tout récemment on a identifié huit gènes qui se repositionnent dans les noyaux des cellules dans le cancer du sein invasif par rapport au tissu sain du sein. Le gène *HES5* présente une localisation altérée dans toutes les tumeurs examinées (MEABURN *et al.*, 2009).

En résumé des groupes de gènes se retrouvent physiquement très proches dans le noyau pour un temps donné et sous l'influence d'un cadre régulateur adéquat pour accomplir une fonction précise. Ceci est illustré par les nucléoles autour desquels les chromosomes acrocentriques porteurs de NOR (Nucleolar Organizer Region) se regroupent (BOLZER *et al.*, 2005). Ce phénomène est encore plus vrai dans les

cellules tumorales qui ont une évolution dynamique dans le temps pour s'adapter à l'environnement mais aussi pour résister aux traitements. Pour comprendre ces différentes propriétés tumorales, il faut une utilisation combinée ou individuelle de ces différentes techniques décrites ci-dessus qui permettent de rechercher des marqueurs biologiques. La mise en évidence de ces derniers peut permettre de comprendre la genèse, l'évolution clinique et de suivre la réponse aux traitements de la tumeur.

1.8 Biomarqueurs et gliomes

L'actualité médicale est inondée par des publications sur les biomarqueurs. Une petite recherche dans pubmed montre plus de 450 000 publications sur les biomarqueurs et des dizaines de milliers reliés aux cancers (HUTCHINSON et DeVITA, 2009). Un biomarqueur peut-être défini comme étant une caractéristique biochimique utilisée comme un indicateur d'un état biologique qui, objectivement mesuré et évalué, identifie des processus biologiques normaux ou pathologiques ou des réponses à une intervention thérapeutique (ADDONA *et al.*, 2009; CARROLL, 2007a; CARROLL, 2007b; HUTCHINSON et DeVITA, 2009; RATAIN et GLASSMAN, 2007). En d'autres termes un biomarqueur est un indicateur objectif et fiable qui détermine des processus biologiques normaux ou pathologiques et des réponses à un traitement. Il peut être un anticorps, une variation dans le nombre de copies (CNV), l'expression d'un ARNm, un ARNm, une protéine, un métabolite, des cellules tumorales circulantes, de l'ADN libre circulant dans le sérum, l'altération d'un gène, des cellules souches cancéreuses (CSC), etc. Il est recherché

dans le sang, le sérum, les humeurs de l'organisme ou les tissus. Un biomarqueur doit avoir les propriétés suivantes :

- précis et sensible en identifiant tous les positifs;
- spécifique en donnant un minimum de faux positifs et être spécifique à la condition donnée;
- facilement quantifiable dans les échantillons;
- d'un faible coût et rapidement identifiable
- et enfin doit pouvoir être déterminé en format à haut débit.

En résumé un biomarqueur doit pouvoir détecter la maladie, la classer, prédire la réponse au traitement, déterminer l'efficacité du traitement, suivre la conformité du traitement, suivre la progression et la récurrence de cette maladie. C'est pourquoi on peut regrouper les biomarqueurs en trois classes à savoir les biomarqueurs pronostiques, les biomarqueurs prédictifs et enfin les biomarqueurs pharmacodynamiques. Deux biomarqueurs semblent être prépondérantes du fait de leur rôle dans la gliomagenèse.

C'est ainsi qu'il a été possible de trouver des mutations récurrentes sur le site actif de l'isocitrate déshydrogénase 1 (*IDH1*) chez 12% des patients qui présentent un glioblastome (PARSONS *et al.*, 2008). Les mutations de *IDH1* sont retrouvées donc dans une fraction des GBM et plus précisément dans les GBM secondaires. Les deux gènes *IDH1* et *IDH2* encodent des enzymes isocitrates déshydrogénases qui sont NADP dépendantes et leurs mutations entraînent une activité enzymatique

réduite (YAN *et al.*, 2009). Les mutations sur l'acide aminé 132 de *IDH1* sont les plus fréquentes et sont retrouvées dans 70% des astrocytomes (grade II et III), des GBM secondaires et des oligodendrogliomes (SANSON *et al.*, 2009). Cette mutation est associée à un meilleur devenir pour les trois grades de gliomes et est inversement corrélée avec le grade étant présente chez 77% des gliomes de grade II, 55% des gliomes de grade III et 6% des GBM. De plus les mutations de *IDH1* sont étroitement associées avec la codélétion 1p/19q. Cependant cette mutation est mutuellement exclusive avec l'amplification de *EGFR* et la perte du chromosome 10. Enfin cette mutation pourrait devenir un important biomarqueur pronostique dans les grades II à IV (SANSON *et al.*, 2009). Les tumeurs sans mutation de *IDH1* exhibent souvent une mutation sur l'acide aminé analogue (R172) de *IDH2* dans les GBM. En définitive il est facile de remarquer que ces deux biomarqueurs ont un impact plus marqué sur les GBM secondaires par rapport aux GBM primaires. Étant donné que ces dernières sont les formes les plus fréquentes des GBM, la valeur exhaustive de ces biomarqueurs est réduite. Il est aussi tentant de penser que le meilleur devenir des patients avec GBM ayant un de ces deux biomarqueurs serait plutôt lié à l'évolution normale des GBM secondaires de bas grade à haut grade. D'autres études seraient nécessaires pour mieux étayer la valeur comme biomarqueurs de ces deux gènes. De plus les mutations de *IDH1* sont étroitement associées avec le statut de la méthylation du promoteur de *MGMT* ou O⁶ methylguanine-DNA-methyltransférase qui a été décrite comme un facteur potentiellement prédictif de la réponse aux traitements avec les agents alkylants mais la méthylation de *MGMT* existe seulement dans une fraction des GBM (ESTELLER *et al.*, 2000 ; STUPP *et al.*, 2009 ; HEGI *et al.*, 2005). En effet, cette

méthylation ou même hyperméthylation de ce promoteur est décrite dans 50% des GBM (YAMINI *et al.*, 2007). Normalement le gène *MGMT* encode des protéines de réparation de l'ADN et protège partiellement les cellules normales et les cellules cancéreuses des agents carcinogènes et des agents alkylants (GERSON, 2004 ; PEGG, 2000). Ces derniers se lient en position O-6 de la guanine sur plusieurs sites sur l'ADN génomique entraînant des « cross-link » ou liaisons croisées dans l'ADN et enfin à l'apoptose (PEGG, 2000). Ainsi l'événement épigénétique de méthylation du promoteur de ce gène entraîne l'inhibition de la transcription de ce dernier jouant un rôle clé dans l'initiation et la progression du cancer. L'hyperméthylation du promoteur du gène *MGMT* dans les GBM est corrélé à une déficience dans la réparation de l'ADN par « mismatch » ou mésappariement donnant un phénotype d'hypermutableté. La conséquence de tout ceci est une meilleure réponse aux agents alkylants des GBM (HEGI *et al.*, 2005; Everhard *et al.*, 2006). C'est ainsi que plusieurs travaux ont montré une meilleure réponse aux traitements par les agents alkylants et par les radiations des patients présentant un GBM ou un gliome de bas grade (HEGI *et al.*, 2005; EVERHARD *et al.*, 2006 ; BRANDES *et al.*, 2008). Ce phénomène d'hyperméthylation du gène *MGMT* est plus fréquemment retrouvé dans les GBM secondaires (OHGAKI et KLEIHUES, 2007). Cependant des études plus récentes ont montré des insuffisances quant à la qualité de *MGMT* comme biomarqueur dans les GBM car l'expression de *MGMT* est un phénomène complexe dans lequel plusieurs facteurs en dehors des mécanismes épigénétiques sont impliqués (MELLAI *et al.*, 2009) d'où la nécessité d'autres études de validation de ce biomarqueur.

Des études plus récentes ont identifié cinq loci de risque de survenue pour les gliomes à 5p15.33 (*TERT*); 20q13.33 (*RTEL1*); 11q23.3 (*PHLDB1*), 8q24.21 (*CCDC26*); 9p21.3 (*CDKN2A-CDKN2B*) (SHETE *et al.*, 2009; WRENSCH *et al.*, 2009).

1.9. Objectif de notre recherche

1.9.1. Contexte

Le développement d'une panoplie d'outils d'investigation toujours plus performants pour étudier les cancers, a permis de mieux comprendre les bases génétiques et moléculaires de plusieurs néoplasies malignes et de dégager de nouvelles stratégies thérapeutiques. La recherche de biomarqueurs en oncologie revêt de plus en plus une importance capitale et mobilise beaucoup de chercheurs. En effet la découverte d'un biomarqueur et la compréhension de sa base moléculaire permettent de développer des molécules antagonistes permettant de traiter la tumeur. C'est le principe de la thérapie moléculaire ciblée. On peut citer comme exemple la translocation *BCR/ABL1* dans la LMC et de son médicament dérivé le Gleevec qui permet de traiter cette hémopathie maligne. Un autre exemple est la translocation *PML/RARA* qui a permis la découverte de l'acide rétinoïque et de ses dérivés pour le traitement de la leucémie promyélocytaire. Un dernier exemple plus récent dans les tumeurs épithéliales est la mise en évidence de la translocation *TMPRSS2/ETS* dans le cancer de la prostate. Cette translocation est retrouvée dans plus de 75% des cancers de la prostate qui sont hormono-dépendant (androgènes). Elle entraîne une surexpression du récepteur androgénique et donc des androgènes. C'est pourquoi le

traitement pour ce type de cancer par inhibition des androgènes marche bien. Cette découverte indique aussi que les translocations fonctionnelles seraient beaucoup plus fréquentes qu'on ne le pensait dans les cancers épithéliaux. Qu'en est-il des gliomes ou tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes? La seule percée importante dans les gliomes reste la découverte de la perte du bras court du chromosome 1 et celle du bras long du chromosome 19 comme marqueur de bonne réponse à la chimiothérapie adjuvante des oligodendrogliomes. Ces délétions des deux bras chromosomiques résultent de la translocation entre les chromosomes 1 et 19 (JENKINS *et al.*, 2006; GRIFFIN *et al.*, 2006). Les origines des autres formes de délétions 1p/19q qui sont interstitielles ou terminales ne sont pas encore élucidées. Récemment il a été mis en évidence cinq loci (voir page 40) impliqués dans la survenue de gliomes et les voies moléculaires de progression des gliomes sont bien définies. Cependant les anomalies génétiques qui sont à l'origine des gliomes demeurent inconnues. Ces tumeurs sont caractérisées par une nature infiltrante empêchant toute exérèse chirurgicale totale. Leur pronostic vital demeure en général médiocre malgré la mise en œuvre de traitement adjuvant comme la radiothérapie, la chimiothérapie et aussi de nouvelles thérapeutiques ciblées. En effet, ces tumeurs présentent des résistances à toutes ces formes de traitement et même aux nouvelles stratégies thérapeutiques. Les bases génétiques et moléculaires de ces résistances sont encore inconnues. En définitive la compréhension génétique et moléculaire des gliomes reste un vaste champ d'investigation à labourer. Le CHUS est un grand centre de prise en charge médicale et de traitement des tumeurs cérébrales. Cette opportunité nous a permis d'entreprendre la recherche des anomalies génétiques et moléculaires présentes dans ces tumeurs en utilisant les outils de cytogénétique

conventionnelle et moléculaire ainsi que de la génétique moléculaire. Cette étude devrait nous permettre d'approfondir nos connaissances de ces tumeurs et de trouver de nouveaux marqueurs biologiques qui pourraient déboucher sur de nouveaux traitements efficaces en vue d'améliorer le sort des patients atteints de gliomes.

1.9.2. Objectifs généraux

➤ Développer et valider de nouveaux outils d'investigation des tumeurs cérébrales primaires.

➤ Identifier certaines anomalies chromosomiques, génétiques et moléculaires qui pourraient être à la base de la survenue des tumeurs cérébrales primaires en vue de les utiliser comme biomarqueurs pour le diagnostic, le suivi du traitement et comme cibles de nouvelles stratégies thérapeutiques pour combattre ces dites tumeurs.

➤ Établir une biobanque des tumeurs cérébrales primaires au CHUS.

1.9.3. Objectifs spécifiques par chapitre

1.9.3.1. Chapitre 1 : Les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes

Article 1 : Is the 1p/19q deletion a diagnostic marker of oligodendrogliomas?

➤ Appliquer la technique des empreintes cellulaires ou « touch preparation » avec des fragments de tumeurs cérébrales prélevés lors de la chirurgie à l'étude de ces tumeurs.

➤ Réaliser prospectivement la technique FISH sur ces empreintes pour rechercher les délétions 1p et 19q.

- Réaliser rétrospectivement la technique FISH sur des coupes de tissu de tumeurs oligodendrogiales archivées de patients traités au CHUS pour rechercher les délétions 1p et 19q.
- Déterminer le seuil de positivité des délétions 1p et 19q dans les échantillons d'empreintes cellulaires.
- Comparer la technique FISH sur coupes de tissu et sur empreintes cellulaires pour définir la meilleure méthode de recherche par FISH des délétions 1p et 19q.
- Mettre en évidence la présence des délétions 1p et 19q par la technique de la perte d'hétérozygotie à partir d'ADN extrait à partir de la tumeur et du sang du patient.
- Développer une stratégie et une technique efficace, rapide et fiable de détermination des délétions 1p et 19q chez tout patient porteur d'oligodendrogliome et opéré au CHUS.
- Corréler les résultats de la recherche des délétions 1p et 19q avec le diagnostic pathologique et les renseignements cliniques des patients.
- Évaluer si la délétion 1p/19q peut servir de biomarqueur diagnostique des oligodendrogliomes.

Article 2 : A new der(1;7)(q10;p10) leading to a singular 1p loss in a case of anaplastic oligoastrocytoma

- Développer une technique de mise en culture et de récolte pour obtenir des métaphases analysables des tumeurs oligodendrogiales.

- Déterminer le caryotype de ces tumeurs cérébrales oligodendrogiales mises en culture.
- Rechercher les anomalies chromosomiques présentes dans ces tumeurs oligodendrogiales.
- Investiguer les mécanismes chromosomiques responsables des délétions 1p et 19q.
- Appliquer la technique FISH pour déterminer le nombre de copies des gènes *TP53*, *MYC* et *PTEN*.
- Corréler ces résultats avec le diagnostic pathologique et les renseignements cliniques.

1.9.3.2. Chapitre 2 : Les astrocytomes et les glioblastomes

Article 1 : Three-dimensional (3D) nuclear telomere architecture is associated with differential time to progression and overall survival in glioblastoma patients

- Appliquer la technique « TeloView » pour étudier l'organisation en trois dimensions des télomères et la formation d'agrégats télomériques dans les glioblastomes.
- Appliquer la technique « TeloScan » pour étudier l'organisation en trois dimensions des télomères et la formation d'agrégats télomériques dans les glioblastomes.

☛ Comparer les techniques « TeloView » et « TeloScan » pour étudier l'organisation en trois dimensions des télomères et la formation d'agrégats télomériques dans les glioblastomes.

☛ Déterminer l'organisation nucléaire en trois dimensions des télomères dans les glioblastomes par ces deux méthodes.

☛ Corréler les résultats obtenus avec les diagnostics pathologiques et les renseignements cliniques des patients.

1.9.3.3. Chapitre 3 (annexe) : Traitement et nouvelles stratégies thérapeutiques des tumeurs cérébrales

Article 1 : EGFR inhibitors in the treatment of glioblastoma multiform: old clinical allies and newly emerging therapeutic concepts.

☛ Décrire les traitements traditionnels et standard des tumeurs cérébrales.

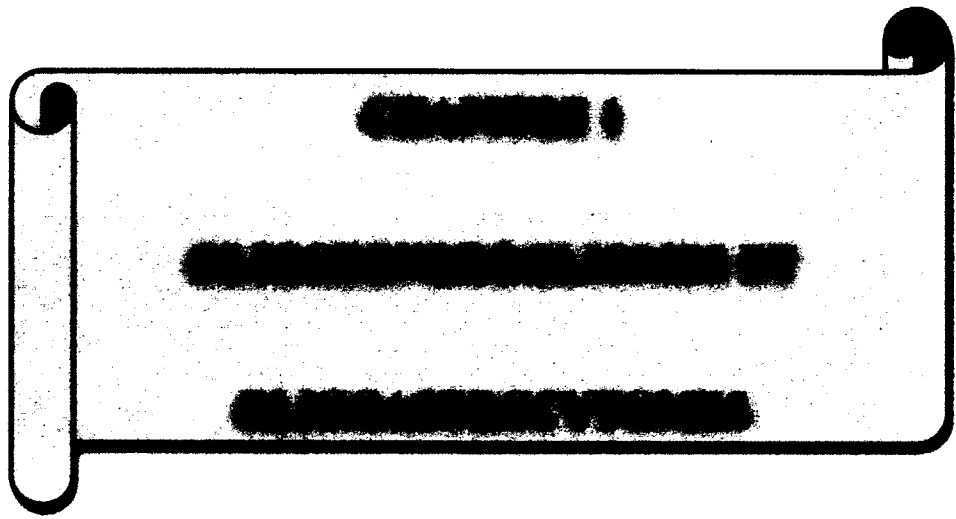
☛ Évaluer l'importance des nouvelles stratégies thérapeutiques dans les tumeurs cérébrales.

☛ Décrire *EGFR* (epidermal growth factor receptor) et ses variants dans les glioblastomes.

☛ Faire le bilan des nouvelles stratégies thérapeutiques développées à partir de *EGFR* et de ses variants.

☛ Comprendre comment les cellules souches des tumeurs cérébrales interviennent dans la résistance aux traitements.





Résumé

Objectif : Le diagnostic et la classification des gliomes infiltrants et diffus sont basés sur leur apparence histopathologique. Cependant, la délimitation histopathologique des gliomes diffus peut être difficile à cause de critères subjectifs et vagues. Il a été montré que la délétion combinée 1p-/19q- est un puissant marqueur prédictif de bonne réponse à la chimiothérapie et de survie dans les oligodendrogliomes. Cette délétion combinée 1p-/19q- pourrait être considérée comme un biomarqueur objectif et un sceau diagnostique des oligodendrogliomes.

Design expérimental : Nous avons entrepris des études rétrospective et prospective des patients à l'origine diagnostiqués comme atteints d'oligodendrogliomes ou d'oligoastrocytomes et qui sont suivis au CHUS en utilisant des techniques de génétique moléculaire. La technique d'hybridation *in situ* observée en fluorescence en utilisant des sondes marquées spécifiques des chromosomes 1 et 19, a été appliquée rétrospectivement sur 22 coupes de tissu encastres dans la paraffine et prospectivement sur 15 échantillons d'empreintes sur lames. Elle a été combinée à la recherche de la perte d'hétérozygotie sur 11 patients avec des marqueurs microsatellites spécifiques des chromosomes 1 et 19.

Résultats : Nos résultats montrent 24 cas de délétion combinée 1p-/19q-, un cas avec délétion 1p- seule et deux cas avec délétion 19q- seule. La longueur de la plus grande délétion a été cartographiée entre le locus D1S2795 (1p36.31) et le locus D1S2722 (1p34.2) pour le chromosome 1; et entre le locus D19S416 (19q13.11) et le locus D19S397 (19q13.14) pour le chromosome 19 en utilisant la LOH. Tous les

cas d'oligodendrogliomes purs dans notre étude ont présenté la délétion combinée 1p-/19q-.

Conclusion: Nos résultats pris ensemble avec les précédents résultats publiés dans la littérature, montrent que la délétion 1p-/19q- serait un marqueur diagnostique des oligodendrogliomes purs et pourrait être utilisée pour améliorer le diagnostic des oligodendrogliomes en combinaison avec l'examen histologique. La FISH sur empreintes cellulaires représente une méthode simple pour définir le statut de la délétion 1p-/19q- en 24 heures.

Mots clés : la délétion 1p/19q; oligodendrogliomes; gliomes; perte d'hétérozygotie; génétique et cytogénétique moléculaires.

Ma contribution : J'ai fait le design expérimental et planifié toutes les expériences. J'ai effectué toutes les manipulations qui ont conduit à cet article. J'ai écrit une première version complète de cet article. J'ai aussi écrit les réponses aux commentaires des évaluateurs. Cet article contient 3 tableaux et 4 figures que j'ai conçus.

**IS THE 1p/19q DELETION A DIAGNOSTIC MARKER OF
OLIGODENDROGLIOMAS?**

Macoura GADJI^a, David FORTIN^b, Ana-Maria TSANACLIS^c, and
Régen DROUIN^{a*}

Author affiliations:

- a) Division of Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, 3001 12th Avenue North, Sherbrooke J1H 5N4, Quebec, Canada
- b) Division of Neurosurgery, Department of Surgery, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, 3001 12th Avenue North, Sherbrooke J1H 5N4, Quebec, Canada
- c) Department of Pathology, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, 3001 12th Avenue North, Sherbrooke J1H 5N4, Quebec, Canada

Running title: The 1p/19q deletion in oligodendrogliomas

Key words: 1p/19q deletion; oligodendrogliomas; gliomas; loss of heterozygosity; molecular cytogenetics and genetics

The diagnosis and classification of diffusely infiltrative gliomas are based on their histopathological appearance; however, histopathological delineation of diffuse gliomas can be difficult because of vague and subjective histopathological criteria. Combined loss of chromosome arms 1p and 19q (denoted as 1p-/19q-) has proven to be a powerful predictor of chemotherapeutic response and survival in oligodendrogliomas. We undertook retrospective and prospective studies of brain tumor patients originally diagnosed as oligodendrogliomas or oligoastrocytomas patients followed at our institution using molecular genetic techniques. Fluorescence in situ hybridization using probes specific for chromosomes 1 and 19 was performed on 22 paraffin-embedded tissues retrospectively; 15 touch-preparation smear samples were studied prospectively; and loss of heterozygosity (LOH) screening was performed on 11 samples with microsatellite markers specific to chromosome 1 and chromosome 19. Of the 37 cases, 24 had 1p-/19q-, 1 case had 1p- only, 2 cases had 19q- only, and 10 cases had no deletion. The length of the largest deletion was mapped between markers D1S2795 (1p36.31 locus) and D1S2722 (1p34.2 locus) and between markers D19S416 (19q13.11 locus) and D19S397 (19q13.14 locus), using LOH. All of the pure oligodendrogliomas (n = 7) harbored 1p-/19q-. In light of previous findings, the 1p-/19q- combination appears to be an objective diagnostic marker of classic oligodendrogliomas, one that can be used, in combination with histological examination, to improve the diagnosis of oligodendroglioma. Fluorescence in situ hybridization on touch preparations is a simple way to obtain information on 1p-/19q- in 24 hours.

Introduction

Low grade oligodendrogliomas constitute approximately 2.5% of all primary brain tumors, and their malignant counterpart accounts for 1.2% [1-3], although more recent studies have reported a much higher incidence (25 to 33% of all primary brain tumors) based on expanded diagnostic criteria. Histopathological assessment of oligodendroglial tumors remains the gold standard in everyday practice [4]. The triad of uniformly round nuclei, perinuclear haloes and an even cellular distribution together with a delicate vascular web (the so-called chicken-wire appearance) in a context of infiltration of adjacent brain parenchyma represents the classical criteria for a histopathological diagnosis of oligodendroglioma [1]. In a significant number of these lesions, however, the microscopic morphology is not so clear-cut, and the distinction from other glial lesions may be difficult [5]. The issue is further complicated when histopathological distinction has to be made between oligoastrocytomas and either oligodendrogliomas or astrocytomas, a distinction of clinical importance in terms of prognostic and therapeutic implications. Identification of characteristics inherent to the tumor type is further complicated by regional tumor heterogeneity and sampling error. One consequence of this subjectivity in diagnostic criteria is a high level of intraobserver and interobserver variability, which decreases reproducibility [6-9]. It is for these reasons that a search for an objective diagnostic tool for the oligodendroglial tumors has been a long one. In 1998, Cairncross et al. [10] identified the combined loss of the short arm chromosome 1 (1p-) and long arm of chromosome 19 (19q-) as predictive of chemotherapy response and longer survival, in a retrospective study on

oligodendroglial tumors. The finding was later confirmed in prospective studies, and this genetic alteration, commonly denoted as 1p-/19q-, has now been reported in up to 85% of oligodendrogliomas and 50% of oligoastrocytomas [11-16]. Although the combined 1p-/19q- is associated with the oligodendroglial phenotype, these alterations are occasionally encountered in other glioma subtypes, both individually and in combination [17]. Presence of regions of classic histology of oligodendroglioma in a tumor sample is predictive of 1p-/19q- [18, 19]. Nonetheless, oligodendrogliomas do sometimes lack the deletion, and in these cases patient survival is shorter [9, 17], which casts doubt on their true oligodendroglial nature. To date, the 1p-/19q- combination has not been described in hyperplastic, inflammatory, or reactive lesions, and not in neurocytomas, clear-cell ependymomas, dysembryoplastic neuroepithelial tumors (DNETs), and clear-cell meningiomas.

Among available genetic tools, fluorescent in situ hybridization (FISH) and loss of heterozygosity (LOH) techniques are the most widely used for identifying the 1p-/19q-. These deletions have been mapped to different areas of chromosomal arms 1p and 19q or have involved the whole arm [14]. In most cases FISH was performed using commercial or bacterial artificial chromosome probes containing the region or gene of interest on paraffin-embedded tissues, and only non-overlapping nuclei were scored in the great majority of published papers [9, 20-25]. However, there may be very few nonoverlapping nuclei with tissue sections, depending of the thickness of the section and the focal plane of the hybridization signals, which leads to difficulties of interpretation and could explain nondetection of the deletion in

some morphologically typical oligodendroglial tumors. In addition, choosing the right probes to detect all the microdeletions is a hard task. It is also a matter of fact that clear cutoff values for a tumor interpreted as positive for the deletion remain to be defined [19]. Furthermore, adding to the difficulties, a tissue section sometimes has a mixture of normal and tumor cells.

Some authors have suggested that this molecular and chromosomal signature, the combined 1p-/19q-, represents a diagnostic hallmark of oligodendrogliomas, rather than being a marker only of therapeutic sensitivity [6, 7]. Because the proportion of oligodendroglial tumors that express the deletion corresponds to the typical chemosensitive tumor described by Cairncross and Macdonald [26] in 1988, we wondered whether the deletion might not be a better diagnostic criterion than the traditional morphological analysis. Accordingly, we hypothesized that this molecular signature might be a more significant prognostic and diagnostic factor than morphological characterization. This is exemplified by archetypical gene fusions such as *BCR-ABL* (the Philadelphia chromosome, which is pathognomonic for chronic myeloid leukemia and is also present in a subset of acute lymphocytic leukemia [27]) and *PML-RARA* (which is pathognomonic for acute promyelocytic leukemia). We therefore retrospectively and prospectively studied the brain tumor patients originally diagnosed as oligodendrogliomas or oligoastrocytomas patients followed at our institution using cytogenetic and molecular genetic techniques, and we propose a simple approach to including 1p-/19q- as an assay suitable for routine oligodendroglial diagnosis.

2. Materials and methods

2.1. Patients and samples

Patients undergoing or having undergone surgery for an initially diagnosed oligodendroglial or oligoastrocytoma brain tumor at the Sherbrooke University Hospital (CHUS) were enrolled in this study after consent approval by the human ethical committee Board. The patient population was composed of 37 individuals : 13 men (35.1%) and 24 women (64.9%) ranging in age from 18 to 77 years (median, 40.9 years).

A total of 23 paraffin-embedded oligodendroglial tumors were collected retrospectively from archives of the Department of Pathology, and 14 fresh surgical biopsies obtained immediately after resection at the operating room were collected prospectively. For 11 available consenting patients, blood samples were also collected. Saliva was collected from 5 patients, using a DNA self-collection kit (Oragene; DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Canada). The blood DNA was purified using an extraction kit (Qiagen, Valencia, CA; Mississauga, Ontario, Canada). Tumor DNA was extracted using standard phenol-chloroform extraction after pretreatment with proteinase K on 4 fresh resection tissues and on 11 deparaffinated 5- μ m-thick paraffin sections [28].

2.2. Histopathological analysis

Tumors were reviewed and classified according to the 2007 World Health Organization (WHO) classification [1]. After surgical removal, fragments of tumor were fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin. Three-micrometer

sections were stained with hematoxylin and eosin and were submitted to immunohistochemical reactions for the detection of glial fibrillary acidic protein, neurofilaments, and synaptophysin; additional sections were submitted to the Ki-67 antibody for evaluation of the proliferative index. Vascularization and the degree of microvascular proliferation were evaluated with the CD31 antibody. Diagnosis and grading were established according to WHO criteria [1]; tumors exhibiting high cellularity, anaplasia, mitoses and high proliferative index, microvascular proliferation, and necrosis were classified as anaplastic oligodendrogliomas (grade III). Tumors in which a conspicuous neoplastic astrocytic component was detected, were classified as oligoastrocytomas.

2.3. Molecular cytogenetic analysis, evaluation and interpretation

Fluorescent in situ Hybridization (FISH) was performed using Vysis LSI 1p36~1q25 and LSI 19q13~19p13 dual color probe sets (Abbott Molecular, Des Plaines, IL) according to the manufacturer's protocol after pretreatment on 5- μ m-thick paraffin sections ($n = 23$) and on touch-preparation smear slides ($n = 14$) prepared using fresh surgical biopsies. The touch preparations were prepared by smearing a core biopsy onto a glass and then let it air-dried. The touch preparation slides were fixed using Carnoy (3:1 methanol-glacial acetic acid by volume), were air-dried overnight under a chemical hood, and were stored at -20°C until used for FISH. The pretreatment of 5- μ m-thick paraffin section slides consisted of immersing the specimen-slides in xylene three times for 5 minutes. The slides were then incubated in a citrate buffer (pH 6.0) for 20 minutes at 80°C , followed by treatment with pepsin HCl solution (4 mg/mL in 0.9% NaCl, pH 1.5) for 20 -30

minutes at 37°C and rinsing once in standard saline citrate for 5 minutes at room temperature. After that, the slides were dehydrated in three alcohol baths (70, 80, and 100%) for 2 minutes each, and FISH was directly performed according to manufacturer's protocol.

An average of 200 nuclei per slide were scored in the FISH analysis. Only the nonoverlapping, morphologically well-preserved nuclei were included for the deparaffinated 5- μ m-thick paraffin sections; in touch preparation slides, almost all nuclei were nonoverlapping. For each cell, the ratio between the paired probes on chromosomes 1 and 19 was analyzed. The green signal in the probes used served as a control, and the deletion per nucleus showed that the number of green signals was higher than the number of red signals. A case was considered deleted with 1p, 19q or both when the scored nuclei displayed an imbalance between green and red signals.

Each slide was examined using an Olympus BX61 microscope equipped with appropriate filters at x1000 magnification. The pictures of selected cells were taken using a Compulog IMAC-CCD S30 video camera module and were analyzed using ISIS in situ imaging system (ISIS 2) software (version 2.5; MetaSystems, Altussheim, Germany, Belmont, MA).

2.4. Molecular genetic analysis, evaluation and interpretation

Loss of heterozygosity analyses were performed using specific microsatellite markers for chromosomes 1 and 19, with a resolution in a 6% polyacrylamide gel

after PCR amplification of DNA. Ten polymorphic microsatellite markers were chosen for chromosomes 1 (eight test markers on the short arm and two control markers on the long arm): D1S2795 (1p36.31), D1S2666 (1p36.23), D1S244 (1p36.22), D1S2676 (1p34.3), D1S2729 (1p34.3), D1S2722 (1p34.2), D1S508 (1p36.31~p36.21), D1S2734 (1p35.36), D1S252 (1q21), D1S2346 (1q22). Ten polymorphic microsatellite markers were also chosen for chromosome 19 (nine test markers on the long arm and one control marker on the short arm): D19S412 (19q13.32), D19S559 (19q13.32), D19S200 (19q13.2), D19S397 (19q13.14), D19S422 (19q13.13), D19S425 (19q13.12), D19S416 (19q13.11), D19S112 (19q13.3), D19S556 (19p13.13). All markers were obtained from IDT (Coralville, IA).

The PCR reaction comprised 10-30 ng of genomic DNA, 2.5 mmol/L of dNTPs (Roche molecular diagnosis), 1 μ mol/L of the forward primer, and 1 μ mol/L of the reverse primer. The forward primer was labeled with IRD700 (M13IRD700; Li-Cor, Lincoln, NE,) for direct detection. The amplification reaction (Biometra thermocycler; Montreal Biotech, Kirkland, Quebec, Canada) contained HotStart *Taq* polymerase (5 U/ μ L) (Qiagen) and was cycled 35 times after preheating at 95°C for 15 minutes: denaturation at 95°C for 40 seconds; annealing at 55°C for 30 seconds; and extension at 72°C for 40 seconds. The amplified products were resolved in 6% polyacrylamide gels using the Li-Cor sequencer (NEN 4300L DNA analyzer) according to the manufacturer 's protocol. For all ambiguous marker results, the reaction was repeated performed two or three times before any conclusion was made about deletion.

Paired blood, tumor, and (for five cases) saliva samples were analyzed for LOH using 19 microsatellite markers. An absence or a significant reduction in intensity of > 50% in the tumor lane compared to the corresponding blood and saliva lanes was scored as LOH.

2.5. Statistical analysis

SSPS software (version 13.0; SPSS, Chicago, IL) was used for Fisher's exact, Kruskal-Wallis, and Mann-Whitney tests, and Kaplan-Meier statistical analysis curves were generated. Survival time was measured from date of diagnosis and censored at the same time of follow-up fixed arbitrary at the date of data analysis or patient death. All reported *P*-values were two-tailed and values of <0.05 were considered statistically significant. The cutoff significance for the presence of 1p-/19q- was determined using the 7:52:35 AM (SAS version 9; SAS Institute, Cary, NC).

3. Results

3.1. Pathological diagnosis

Data was collected on a total of 37 patients operated, from 1993 to 2007. All of these 37 patients were initially diagnosed with an oligodendroglial tumor. Specifically, 7 oligodendrogliomas, 15 anaplastic oligodendrogliomas, 7 oligoastrocytomas, and 8 anaplastic oligoastrocytomas were classified based on traditional morphological analysis; upon review for this study, however, 5 of the 7

oligoastrocytoma cases were reclassified as malignant astrocytic tumors (Tables 1 and 2).

The final pathologic diagnosis for all samples is given in Tables 1 and 2, along with the results obtained with FISH study for 1p-/19q-. Allelic chromosomal 1p-/19q- was present in all 7 of the low-grade oligodendrogliomas (100%), in 13 of 15 anaplastic oligodendrogliomas (87%), in 4 of 8 anaplastic oligoastrocytomas (50%), in neither of the 2 low-grade oligoastrocytoma, in 1 of 5 astrocytic tumors (20%). The frequency of the presence of 1p-/19q- in oligodendrogliomas grade II and grade III was significantly different than for the other tumor subtypes (oligoastrocytomas and astrocytic tumors) ($P = 0.006$).

Table 1: FISH findings for 1p and 19q deletions, by histologic type in 37 brain tumor patients originally diagnosed as oligodendrogliomas or oligoastrocytomas patients

| Histology | FISH ^a | | Total |
|--|-------------------|----------|-------|
| | No deletion | 1p-,19q- | |
| Oligodendroglioma | 0 | 7 | 7 |
| Anaplastic oligodendroglioma | 2 | 13 | 15 |
| Oligoastrocytoma | 0 | 2 | 2 |
| Anaplastic oligoastrocytoma | 4 | 4 | 8 |
| Other astrocytic malignancy ^b | 4 | 1 | 5 |
| Total | 10 | 27 | 37 |

Abbreviations : FISH, fluorescent in situ hybridization

^a For délétions, most but not all cases exhibited both 1p- and 19-, See Table 2 for détail.

^b Five cases originally classified as oligoastrocytoma based on traditional morphological analysis alone were reclassified as gliosarcoma ($n = 3$), glioblastoma ($n = 1$), and anaplastic astrocytoma ($n = 1$).

Table 2: Clinical data, with treatment and outcome, and FISH and LOH findings for 37 brain tumor patients originally diagnosed as oligodendrogliomas or oligoastrocytomas patients

| Case | Diagnosis ^a | Age at Dx, yr | Clinical State | First-line Tx | Responsive to Tx | Overall survival, d | FISH results | LOH results ^b |
|------|------------------------------|---------------|----------------|----------------|------------------|---------------------|--------------|--------------------------|
| P1 | anaplastic oligodendroglioma | 52 | progression | none | | 2,468 | 1p-, 19q- | + |
| P2 | anaplastic oligodendroglioma | 29 | dead | IA carboplatin | yes | 1,725 | no del | + |
| P3 | gliosarcoma | 48 | dead | IA carboplatin | no | 309 | no del | - |
| P4 | anaplastic oligodendroglioma | 40 | progression | IA carboplatin | yes | 5,931 | 1p-, 19q- | + |
| P5 | anaplastic oligodendroglioma | 30 | dead | IA carboplatin | yes | 1,531 | 1p-, 19q- | + |
| P6 | oligodendroglioma | 40 | stable | none | | 1,764 | 1p-, 19q- | + |
| P7 | anaplastic oligodendroglioma | 32 | progression | IA carboplatin | yes | 4,707 | 1p-, 19q- | + |
| P8 | anaplastic oligoastrocytoma | 39 | progression | IA carboplatin | yes | 2,119 | 1p-, 19q- | + |
| P9 | anaplastic oligodendroglioma | 39 | progression | none | | 371 | 1p-, 19q- | + |
| P10 | anaplastic oligodendroglioma | 29 | stable | none | | 1,142 | 1p-, 19q- | + |
| P11 | anaplastic oligoastrocytoma | 49 | progression | temozolomide | no | 285 | 19q- | - |
| P12 | glioblastoma | 29 | dead | IA carboplatin | yes | 5,414 | 1p-, 19q- | |
| P13 | oligoastrocytoma | 63 | stable | none | | 873 | 1p-, 19q- | |

| | | | | | | | | |
|-----|------------------------------|----|-------------|----------------|-----|-------|-----------|--|
| P14 | anaplastic oligodendroglioma | 49 | dead | IA carboplatin | no | 263 | 1p-, 19q- | |
| P15 | anaplastic oligodendroglioma | 38 | progression | temozolomide | yes | 1,034 | 1p-, 19q- | |
| P16 | oligodendroglioma | 26 | progression | temozolomide | yes | 6,484 | 1p-, 19q- | |
| P17 | oligodendroglioma | 38 | progression | radiotherapy | yes | 5,851 | 1p-, 19q- | |
| P18 | anaplastic oligodendroglioma | 32 | dead | IA carboplatin | yes | 2,418 | 1p-, 19q- | |
| P19 | anaplastic oligodendroglioma | 25 | dead | none | | 11 | 1p-, 19q- | |
| P20 | oligodendroglioma | 42 | progression | none | | 3,963 | 1p-, 19q- | |
| P21 | oligoastrocytoma | 77 | dead | radiotherapy | no | 203 | 1p-, 19q- | |
| P22 | oligodendroglioma | 37 | stable | none | | 1,468 | 1p-, 19q- | |
| P23 | oligodendroglioma | 28 | stable | none | | 1,027 | 1p- | |
| P24 | anaplastic oligodendroglioma | 66 | dead | radiotherapy | no | 141 | 19q- | |
| P25 | gliosarcoma | 45 | dead | temozolomide | no | 309 | no del | |
| P26 | anaplastic oligoastrocytoma | 32 | dead | temozolomide | no | 41 | no del | |
| P27 | anaplastic oligoastrocytoma | 69 | dead | temozolomide | no | 51 | no del | |

| | | | | | | | | |
|-----|------------------------------|----|-------------|----------------|-----|-------|-----------|--|
| P28 | gliosarcoma | 44 | dead | IA carboplatin | no | 308 | no del | |
| P29 | anaplastic astrocytoma | 18 | dead | IA carboplatin | yes | 7,977 | no del | |
| P30 | anaplastic oligoastrocytoma | 77 | dead | temozolomide | yes | 121 | no del | |
| P31 | anaplastic oligodendroglioma | 35 | progression | IA carboplatin | yes | 3,294 | no del | |
| P32 | oligodendroglioma | 30 | progression | IA carboplatin | yes | 5,101 | 1p-, 19q- | |
| P33 | anaplastic oligodendroglioma | 46 | progression | radiotherapy | yes | 3,026 | 1p-, 19q- | |
| P34 | anaplastic oligodendroglioma | 31 | progression | IA carboplatin | yes | 2,511 | 1p-, 19q- | |
| P35 | anaplastic oligoastrocytoma | 27 | dead | none | | 853 | no del | |
| P36 | anaplastic oligoastrocytoma | 32 | stable | none | | 278 | 1p-, 19q- | |
| P37 | Anaplastic oligoastrocytoma | 34 | progression | none | | 697 | 1p-, 19q- | |

Abbreviations: Dx, diagnosis; FISH, fluorescent in situ hybridization; IA, intra-arterial; LOH, loss of heterozygosity; no del, neither 1p nor 19q deletion; Tx, therapy; +, LOH of 1p and 19q; -, no LOH for 1p or 19q.

^a Diagnosis based on review of pathology samples. Age given is age at diagnosis.

^b LOH analysis performed for patients 1-11 only.

3.2. Molecular cytogenetic analysis

The FISH techniques were performed successfully on 37 available specimens (Fig. 1), identifying 24 cases with 1p-/19q-, one case with only 1p-, and two cases with only 19q-. Ten cases had neither deletion.

FISH reaction on a deparaffinated 5- μ m-thick paraffin sections of normal brain tissue displayed a deletion in less than 4%. All cases of tissue sections considered negative for the deletion had a deletion rate of $\leq 5\%$.

The prospective cases were analyzed using touch preparation. This approach allowed us to define a clear threshold to determine whether the deletion is significant (Fig. 2). The mean difference for the group of one signal versus the group of two signals is 39% (+/-12%) for chromosome 1 and 37% (+/-14%) for chromosome 19. Using SAS software version 9 with the ANOVA test to perform the statistical analyses, we established that the threshold for presence of the 1p-/19q- deletions is 20-25% of difference between the short and the long arms for the two chromosomes, respectively ($P = 0.0001$). Therefore, the percentage of 20% is the proportion of cells with a deletion required to assign the deleted status to the tumor.

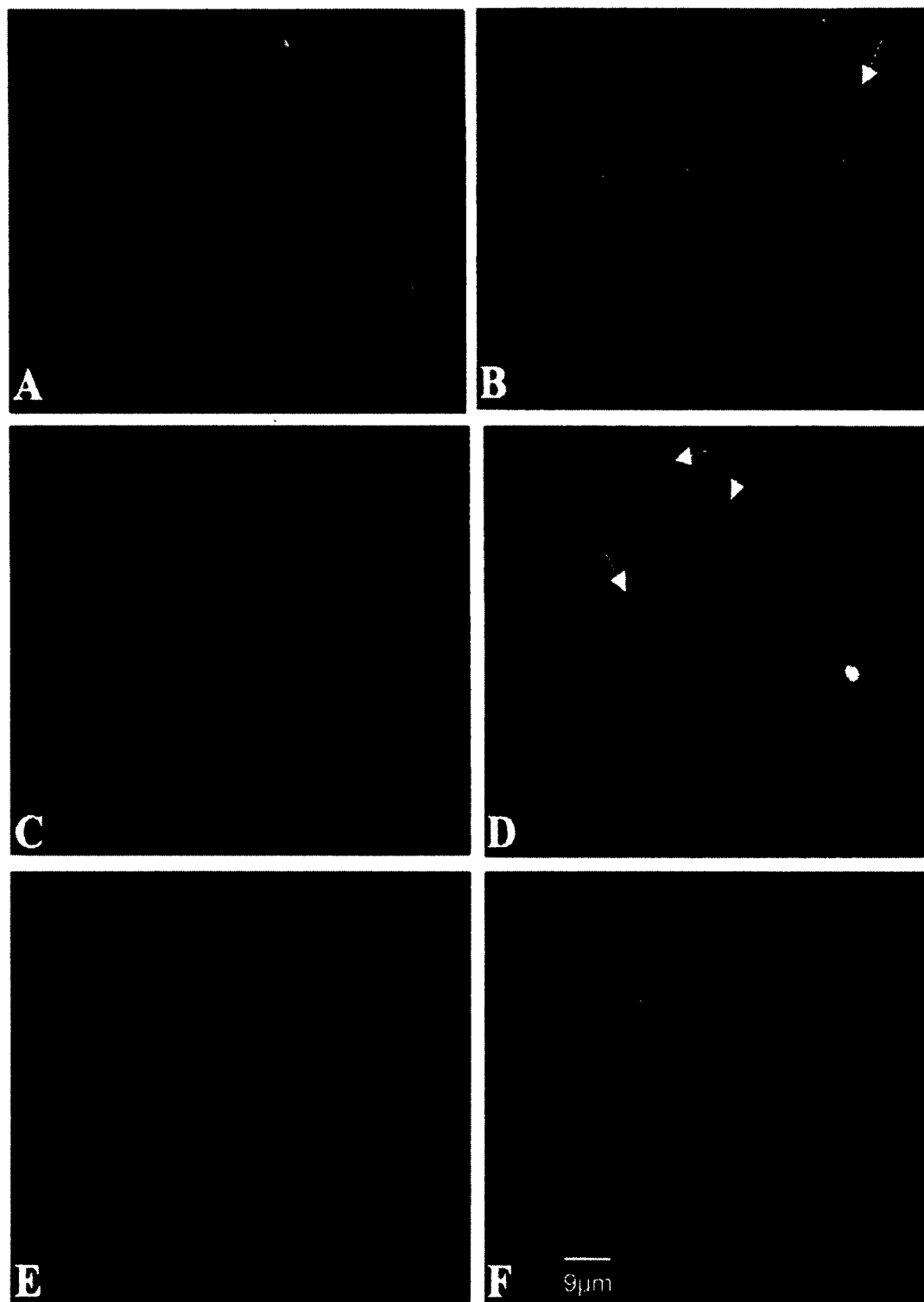


Fig. 1: (A,B) Fluorescence in situ hybridization (FISH) with LSI 1p36 (SpectrumOrange)-1q25 (SpectrumGreen) probes on (A) touch preparation smear

slide and (B) 5- μ m-thick paraffin section. (C,D) FISH with LSI 19q13 (SpectrumOrange)-19p13 (SpectrumGreen) probes on (C) touch preparation smear slide and (D) 5- μ m-thick paraffin section. (E,F) FISH on touch preparation slides in which the polyploid nuclei display 1p and 19q deletions: (E) LSI 1p36 (SpectrumOrange)-1q25 (SpectrumGreen) probes and (F) LSI 19q13 (SpectrumOrange)-19p13 (SpectrumGreen) probes. Imbalance between red spots and green spots indicates deletion of 1p or 19q. (B,D) Arrows indicate the nonoverlapping nuclei, which can be scored in 5- μ m-thick paraffin section.

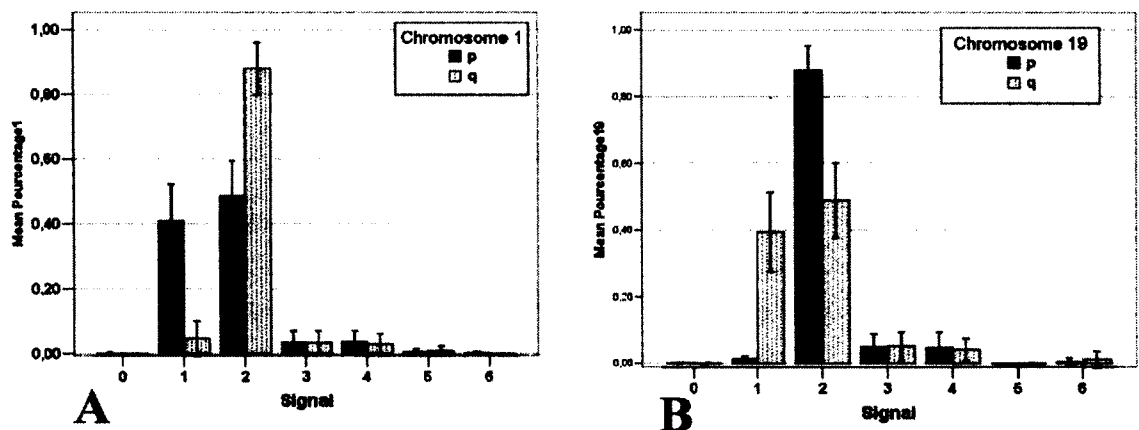


Fig. 2: Signal distribution analysis using only FISH on touch preparation slides of chromosome 1 (A) and chromosome 19 (B) indicates significant variation between the short and long arms for the two chromosomes in group 1 and group 2 signals ($P = 0.0001$) (ANOVA test, SAS software version 9). These statistics determine the percentage of cells with a deletion required to assign the deleted status to the tumor, which was established as 20%.

3.3. Molecular genetic analysis

The length of the largest deletion was mapped between D1S2795 and D1S2722, encompassing 35 Mb for chromosome 1; for chromosome 19, it was between D19S416 and D19S397, encompassing 18.38 Mb (Fig. 3; Table 3). Smaller deletions included 2 Mb (cases P2, P7 and P8; Table 3), 4.5 Mb (case P6; Table 3) and 8 Mb (case P5; Table 3) for 1p and ~1.4 Mb (case P1; Table 3), 7.1 Mb (case P5; Table 3), and deletion of the single locus D19S559 (case P6; Table 3) for 19q.

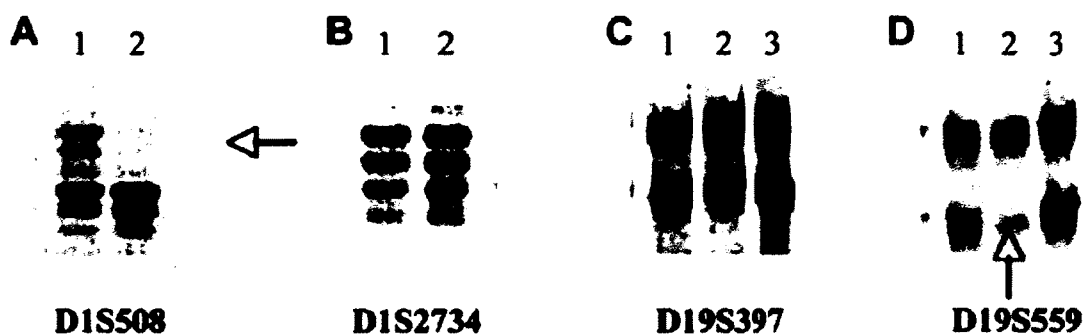


Fig. 3: Loss of heterozygosity analysis using microsatellite markers specific to (A,B) chromosome 1 and to (C,D) chromosome 19. Lane 1, blood DNA; lane 2, tumor DNA; lane 3, saliva DNA. Arrows indicate allelic losses.

Table 3: Loss of heterozygosity studies in 11 brain tumor patients originally diagnosed as oligodendrogliomas or oligoastrocytomas patients

| Marker | Locus | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | P8 | P9 | P10 | P11 |
|---------|----------|----|----|------|----|------|----|----|----|------|------|------|
| D1S2795 | 1p36.31 | - | - | + | + | + | NI | - | - | + | NA | + |
| D1S2666 | 1p36.23 | NA | - | Homo | NA | Homo | - | - | - | Homo | Homo | Homo |
| D1S508 | 1p36.23 | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + |
| D1S244 | 1p36.22 | - | NI | + | NI | NI | NI | NI | NA | NI | NI | + |
| D1S2734 | 1p35.36 | - | + | + | - | - | + | + | + | - | - | + |
| D1S2676 | 1p34.3 | - | + | + | - | - | NI | + | + | - | NI | + |
| D1S2729 | 1p34.3 | - | + | + | - | + | + | + | NA | - | - | + |
| D1S2722 | 1p34.2 | - | + | + | NA | + | + | + | NA | + | + | + |
| D1S252 | 1q21 | + | NI | + | + | NA | + | + | + | + | + | NI |
| D1S2346 | 1q22 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D19S416 | 19q13.11 | - | + | + | + | + | + | + | - | + | - | + |
| D19S425 | 19q13.12 | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + |
| D19S422 | 19q13.13 | + | - | + | NA | + | + | - | - | - | NA | + |
| D19S200 | 19q13.2 | NA | - | + | - | + | + | - | - | - | NA | + |
| D19S559 | 19q13.32 | + | - | + | - | - | - | - | NI | - | - | + |
| D19S112 | 19q13.3 | + | - | + | NI | - | + | - | - | - | - | + |
| D19S412 | 19q13.32 | + | - | + | - | - | + | - | NI | - | - | + |
| D19S397 | 19q13.33 | + | + | + | - | - | + | + | NI | - | + | + |
| D19S556 | 19p13.13 | + | + | + | + | + | + | + | NA | + | NA | + |

Abbreviations: homo, homozygote marker; NA, nonamplification of the DNA from the tumor or both allele deletion; NI, noninformative; Pn, case number; +, allele present; -, allele absent.

3.4. FISH versus microsatellite analysis

With two exceptions, the results were concordant between FISH and LOH. One anaplastic oligodendroglioma did not display any deletion by FISH on paraffin-embedded tissue, whereas LOH identified 1p-/19q- (case P2; Table 3), and in an anaplastic oligoastrocytoma the LOH analysis did not identify the 19q deletion earlier found with FISH (case P11; Table 3).

3.5. Median survival

The Kaplan-Meier median survival of each group, according to final pathological diagnosis, is presented in Figure 4. As expected, the low-grade oligodendroglioma group had the longest median survival (6,484 days). Only one of seven patients died in this small group, which limits the reach of the analysis. The anaplastic oligodendroglioma group had a median survival of 3,226 days, or half the median survival for oligodendroglioma, which is in accord with the literature.

As for the mixed tumors, the prognosis was vastly inferior to that of the pure oligodendrogliomas, with a median survival of 853 days for anaplastic tumors. Results for the low-grade mixed tumors can be discussed only with caution, given the small sample size ($n = 2$): the median survival was only 203 days for these tumors, and neither lesions expressed the deletion

3.6. Deletion and implication on treatment response and survival

The presence of the 1p-/19q- deletion was predictive of treatment response, regardless of pathological diagnosis. This effect was present independent of the treatment modality used: oral chemotherapy with temozolomide, intraarterial

carboplatin chemotherapy, or radiation therapy ($P = 0.043$). The MacDonald radiological response criteria were used, a standard in the field.

Survival analysis in this series is complicated by the fact that only one of the patients with a low-grade oligodendroglioma ($n = 7$) has died. The follow-up for this group is thus insufficient for any firm conclusions. With this limitation in mind, we can nonetheless appreciate the power of the deletion as a predictor of survival when all histological data are pooled: patients with nondeleted samples presented a median survival of 309 days, whereas patients with the deletion depicted a median survival of 6484 days ($P = 0.002$) (Fig. 4). Although the presence of the deletion favorably affected survival in each histological subtype, this difference was more pronounced for the mixed tumors. In these tumors, deleted patients had not reached yet the median survival (mean, 5,842 days), whereas nondeleted patients presented a median of 51 days (mean, 266 days) (Fig. 4). Thus, deletion status was more predictive of survival than histology in the mixed tumors : the low-grade tumor did worse (median survival, 203 days) than the anaplastic tumors (median survival, 853 days).

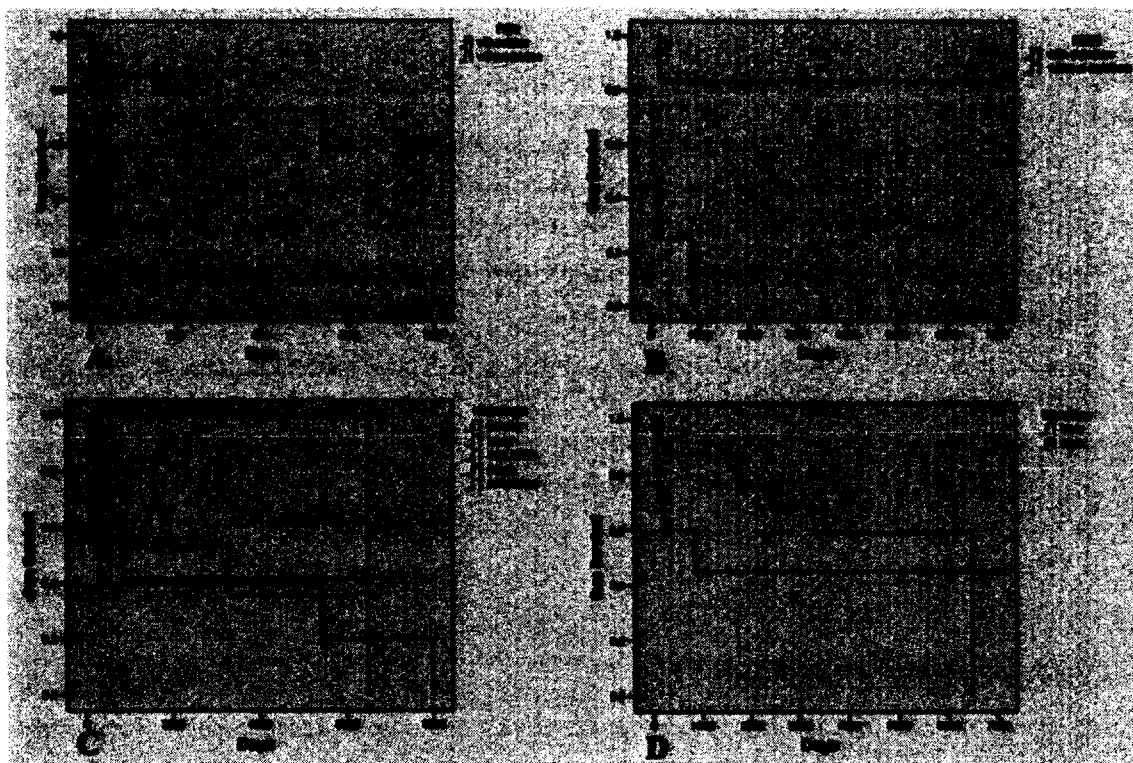


Fig. 4 : Kaplan-Meier survival curves comparing (A) combined 1 p and 19q deletion vs. no deletion ($P = 0.002$), (B) oligoastrocytoma with combined 1p and 19q deletion vs. no deletion ($P = 0.007$), (C) histological grade across all patients ($P = 0.254$), and (D) oligodendroglioma vs. Oligoastrocytoma ($P = 0.161$).

Abbreviations: mixte, oligoastrocytoma; ana mixte, anaplastic oligoastrocytoma; oligo, oligodendroglioma; ana oligo, anaplastic oligodendroglioma.

4. Discussion

In everyday practice, the diagnosis and the classification of diffusely infiltrative gliomas is based on histopathological appearance, which is considered the gold standard for management decisions and prognostication [4,29]. The histopathological delineation of diffuse gliomas can be difficult, however, because of vague and subjective criteria. In a study on diagnostic concordance among four neuropathologists reviewing gliomas, the interobserver agreement peaked at 69%; the inclusion of glioblastomas and other tumors with more classic histology may have increased this figure [9,30-32]. In another similar trial, seven neuropathologists and six surgical pathologists reviewing histological features of oligodendrogliomas found an agreement of 0.05 to 0.8 for identifying features of this group of tumors [31]. A European consortium study found consensus in the diagnosis of only 52% of tumors that had been previously diagnosed as anaplastic oligoastrocytomas by the institution of origin, the initial assessment having been performed by general pathologists and neuropathologists [32]. When a panel of nine experienced neuropathologists analyzed a set of malignant oligodendroglial tumors, the concordance on the panel diagnosis was 86%.

Several factors contribute to the difficulty in establishing diagnosis in diffuse gliomas: (i) there are no definitive immunohistochemical markers for tumoral oligodendroglial cells; (ii) there is a great variation in histological features in tumors of both astrocytic and oligodendrocytic lineage. Some authors stress that even the

2007 criteria proposed by the WHO central nervous system tumors classification [1] are not sufficient for the diagnosis of oligodendrogliomas. It is therefore noteworthy that in the present series there was no tumor with classic oligodendroglial morphology without the deletion. Obviously, the final practical result is that inaccurate diagnosis may lead to inadequate therapeutic decisions, with consequence affecting the quality of life of the patient, as well as long-term survival.

The codeletion 1p-/19q- has proven to be a powerful predictor of chemotherapeutic response and survival in oligodendrogliomas. Could it be more than that - an objective oligodendroglial marker and a diagnostic hallmark of oligodendrogliomas? In the present study, by using FISH and LOH techniques we found that all patients (100%) with pure low-grade oligodendroglial tumors presented the deletion, after pathology sample reassessment. Notably, for the 10 patients without the deletion, 5 cases initially classified as oligodendrogliomas were reclassified as mixed oligodendrogliomas in a blinded fashion.

How important is the codeletion 1p-/19q- in the diagnosis of oligodendroglioma? In clinical studies of oligodendrogliomas, seizures are typically the first symptom at presentation in those oligodendrogliomas that express the codeletion 1p-/19q-. In these tumors, the time between the first symptoms and surgery is usually long. In tumors histologically diagnosed as oligodendrogliomas but lacking the codeletion 1p-/19q-, the median time between first symptom and surgery was 5 months [33]. Magnetic resonance imaging studies have shown that tumors diagnosed as

oligodendrogliomas but without the codeletion 1p-/ 19q- have a more distinct border and a uniform signal on T1- and T2-weighted images [33]. It would thus appear that, even if these lesions retain some morphological characteristics of oligodendrogliomas, their biological behavior is somewhat different from that of tumors with the codeletion 1p-/19q-.

In a study of 18 cases initially diagnosed as oligodendrogliomas, Burger et al. [11] found codeletion of 1p and 19q in 6 cases; after blindly reviewing the 12 remaining cases, those with no 1p-/19q-, the histological diagnosis was changed to astrocytoma, oligoastrocytoma, and glioblastoma; most important, all 6 cases with the chromosomal deletions exhibited the classic morphology of oligodendroglioma. Sasaki et al. [12] reviewed 44 cases of pure low-grade oligodendrogliomas that were separated in two groups according to histology, as classical oligodendrogliomas and as oligodendrogliomas with astrocytic features; deletion in chromosome 1p was found in 19 of 22 classical oligodendrogliomas (86%), whereas 1p deletion was absent in 16 of 22 oligoastrocytomas (73%). Ueki et al. [13] reviewed 33 oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: of these, 8 of 9 tumors with a histological diagnosis of classical oligodendrogliomas exhibited 1p-/19q- and the remaining 1 had noninformative 1p status. Godfraind et al. [18] observed these chromosomal deletions in 21 of 22 histologically classical oligodendrogliomas and concluded that this morphological aspect is predictive of 1p-/19q-; the one specimen without the deletion was further classified as oligoastrocytoma. Finally, in a series of 156 anaplastic oligodendroglial tumors, Dehais et al. [34] estimated the association between 1p and 19q deletion at 0.0001 and the association of the

codeletion 1p- and 19q- with oligodendrogliomas at 0.005. More recently, Nagasaka et al. [35] reported 8 oligodendroglial tumors, all displaying 1p-/19q-.

These findings from genetic studies highlight the importance of establishing the 1p and 19q status in a glial tumor, and specifically in a suspected oligodendroglioma. In the present series, the 1p-/19q- seems to represent a clear-cut feature allowing the distinction between pure oligodendroglial tumors harboring these genetic anomalies with good therapeutic response and other gliomas (including a few disputable oligodendrogliomas) irrespective of morphology, without the deletions and with poor therapeutic response.

Some authors reported better prognosis in patients harboring tumors with deletion of the 1p arm [36] or with combined 1p-/19q- [8,10,17,21,37], irrespective of the grade. The good response of some anaplastic oligodendrogliomas appears to be linked to the presence of deletions in 1p, 19q, or both. In our small series, the best determinant of survival and of response was the presence of the 1p-/19q- codeletion. Many methods have been used to identify loss of these regions, including FISH, LOH, comparative genomic hybridization (CGH), and array CGH. However, metaphase CGH studies at ~10 Mb resolution indicate concurrent whole-arm chromosomal deletion in only 32-75% of oligodendrogliomas; with array CGH analysis at higher resolution, the findings are 37-66% [11,38-43]. To further evaluate the potential diagnostic significance of 1p-/19q-, we used FISH and LOH (the most common methods) to search for 1p-/19q- in 37 patients. We found 24 cases (64.8%) with 1p-/19q-, 1 case with 1p- only, and 2 cases with 19q-; neither deletion was found in the remaining 10 cases.

The majority of cases with 1p-/19q- displayed two FISH signals from the control probe and one from the target probe (2/1 ratio), indicating a LOH status. FISH performed in paraffin sections may suffer from artifacts; alternatively, sampling may not be ideal, as in our case P2 (Table 3), in which necrosis dominated the fragment of tumor used for molecular genetic analysis. The interpretation of FISH results can be difficult in the presence of aneuploidy and polyploidy, where this interpretation was based on the ratio of 1p/1q and 19q/19 p. Losses with ratios such as 3/2, 4/3, or 5/3 can imply LOH, but do not prove it [25,44]. Moreover, those results can be affected by the inclusion of mixed histological tumor type, admixture of normal cells, and sample quality (e.g., tissue sections versus touch preparation slides).

Touch preparation yields a monolayer and nonoverlapping cells for a rapid FISH technique and easy signal analysis. This method allowed us to define a threshold of a 20% difference between the short arm and long arm signal as marking a significant deletion. Accordingly, the presence of normal cells in the tumor sample might affect this value, in line with an average of 35% found in one study [44]. More studies are needed to define this threshold value. FISH has yielded concurrent 1p-/19q- in 38% to 100% of oligodendrogliomas [11,45,46].

With the LOH technique, the largest deletions spanned 35 Mb on 1p and 18 Mb on 19q. The LOH analyses for detection of loss of one of two heterozygous alleles on 1p and 19q have varied in the specific loci measured. We found smaller deletions spanning 2-8 Mb on chromosome arm 1p and 1.4-7 Mb and even a single locus on 19q. Previous LOH analyses have indicated concurrent 1p-/19q- in 46-90% of

oligodendrogliomas [7,10,46,47]. Both FISH and LOH are limited in their ability to detect whole-arm loss, because the probes used cover only a portion of the arm. Additionally, across our population the 1p-/19q- codeletion was located in different regions of chromosome arms 1 and 19, from comprising the whole chromosomal arm deletion to partial terminal chromosomal arm or interstitial chromosomal deletion.

Over the past decade, the region of interest on 1p- deletions has been mapped to 1p36.3, 1p36.1~p36.2, and 1p34~p35, and the region of interest on 19q- (initially located between 19q13.11 and 19q13.4) was narrowed down to 150 kb of genomic sequence and then finally expanded to 3.7 Mb between D19S219 and D19S112. (For reviews, see Jeuken et al. [14] and Hartmann et al. [48].) This variability of the critical region for 1p-/19q- codeletion increases the difficulties for designing a probe for efficient FISH and for small effective microsatellite markers for LOH to map all possible deletions on 1p and 19q. Another limitation of LOH analyses is polyploid cells with 1p-/19q-, such as in the one deletion case missed in our study. Thus, combined FISH and LOH with multiple markers should be helpful in ensuring adequate detection of all 1p-/19q-.

Recent cytogenetic studies of cultured low-grade oligodendroglial tumors showed a chromosomal translocation of 1p and 19q, t(1;19)(q10;p10) [49,50]. Analysis of paraffin-embedded samples suggested that in 91% of the tumors the combined 1p-/19q- was mediated by this translocation, whereas the translocation was identified in only 12% of tumors without the 1p-/19q-. Such findings of a possible mechanism of

1p-/19q- codeletion reinforce the potential of 1p-/19q- as a valid diagnostic tool for classic oligodendroglioma. We feel that thorough further studies on genetic abnormalities of oligodendroglial cells are necessary to bring to light consistent and specific alterations associated with a particular histopathological subtype of glioma. Such findings would have immediate consequences for the classification of these lesions and for subsequent planning of therapeutic measures and prognostication.

5. Conclusions

Although histological evaluation should remain the chief support of brain tumor classification, the growing list of options for cytogenetic analysis has improved the understanding of chromosomal changes in disease initiation, progression, and response to treatment. Based on both FISH and LOH findings, the present study suggests that the 1p-/19q- codeletion in pure oligodendroglial tumors can be considered as a diagnostic, rather than a prognostic marker. The touch preparation technique described in this paper is easy and provides results within 24-48 hours after the surgical procedure, and so it could be used as a routine study to assist the pathologist in the final diagnosis. The use of this method should be helpful to delineate a cutoff significance of 1p-/19q- deletions. In combination with LOH analysis with many specific microsatellite markers on target loci on chromosomes 1 and 19, the 1p-/19q- codeletion should be recovered in all oligodendroglial samples. We recommend two to eight markers per region; this can be easily performed with 40 markers per chromosomal arm (1 and 19q). This number of markers should be enough to identify even very short deletions.

Considering the results obtained in the present study along with other published results, the 1p-/19q- appears to be a valid marker of classic oligodendrogliomas and has the potential to improve the diagnosis of oligodendroglioma in combination with histological examination, in clinical practice. We suggest the use of FISH and LOH on every brain tumor suspected of being an oligodendroglioma. The FISH technique should be performed on touch preparation. The LOH technique can provide confirmation of the deletion identified by FISH, identification of the interstitial deletion that the FISH technique could miss, and a definition of the length of the deletion in aid of a search for putative tumor suppressor genes. Examples of commonly mutated genes have not been forthcoming in the search for potential oligodendroglial tumor suppressor genes within the regions of 1p and 19q loss. Mapping of these chromosome loci will implicate the telomeric region of 1p and 19q. To date, the putative tumor suppressor gene related to oligodendroglioma remains to be found.

Aknowledgements

The authors are grateful to Dr. Joe T.R. Clarke for careful review of the manuscript and important comments, to Mrs Sylvie Breton and Marie Boudrias for their excellent technical help, and to Mrs Marie-Pierre Garrant and Nathalie Carrier for their help with the statistical analyses. This study was supported in part by grant from the Canada Research Chairs Program to R.D. Public Health Minister (MSP) and the National Center of Blood Transfusion (CNTS) of Senegal to M.G. M.G. holds a studentship of the Foundation for research into children's diseases. D.F. holds the National Bank of Canada Chair in Brain Tumor Treatment » and R.D.

holds the Canada Research Chair in Genetics, Mutagenesis, and Cancer.

References

- [1] Reifenberger G, Kros JM, Louis DN, Collins DP. Oligodendrogliomas. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiesler OD, Cavenee WK, editors. WHO classification of tumors of the central nervous system: 4th ed. World Health Organization of Tumours. Geneva: WHO Press, 2007; pp. 54-60.
- [2] Berger MS. Role of surgery in diagnosis and management. In: Apuzzo MLJ, editor. Benign Cerebral Glioma. Park Ridge: AANS, 1995; pp. 293-307.
- [3] Behar T, McMorris FA, Novotny EA, Barker JL, Dubois-Dalcq M. Growth and differentiation properties of O-2A progenitors purified from rat cerebral hemispheres. *J Neurosci Res* 1988;21:168-80.
- [4] Rorke LB. Pathologic diagnosis as the gold standard. *Cancer* 1997;79:665-7.
- [5] Burger PC. What is an oligodendroglioma? *Brain Pathol* 2002;12:257-9.
- [6] Bigner SH, Rasheed BK, Wiltshire R, McLendon RE. Morphologic and molecular genetic aspects of oligodendroglial neoplasms. *Neuro Oncol* 1999;1:52-60.
- [7] Hatanpaa KJ, Burger PC, Eshleman JR, Murphy KM, Berg KD. Molecular diagnosis of oligodendroglioma in paraffin sections. *Lab Invest* 2003;83:419-28.
- [8] Van den Bent MJ, Reni M, Gatta G, Vecht C. Oligodendroglioma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:262-72.
- [9] Giannini C, Burger PC, Berkey BA, Cairncross JG, Jenkins RB, Mehta M, Curran WJ, Aldape K. Anaplastic oligodendroglial tumors: refining the correlation

among histopathology, 1p 19q deletion and clinical outcome in Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *Brain Pathol* 2008;18:360-9.

[10] Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1473-9.

[11] Burger PC, Minn AY, Smith JS, Borell TJ, Jedlicka AE, Huntley BK, Goldthwaite PT, Jenkins RB, Feuerstein BG. Losses of chromosomal arms 1p and 19q in the diagnosis of oligodendroglioma. A study of paraffin-embedded sections. *Mod Pathol* 2001;14:842-53.

[12] Sasaki H, Zlatescu MC, Betensky RA, Johnk LB, Cutone AN, Cairncross JG, Louis DN. Histopathological-molecular genetic correlations in referral pathologist-diagnosed low-grade "oligodendroglioma". *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:58-63.

[13] Ueki K, Nishikawa R, Nakazato Y, Hirose T, Hirato J, Funada N, Fujimaki T, Hojo S, Kubo O, Ide T, Usui M, Ochiai C, Ito S, Takahashi H, Mukasa A, Asai A, Kirino T. Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors. *Clin Cancer Res* 2002;8:196-201.

[14] Jeuken JW, von Deimling A, Wesseling P. Molecular pathogenesis of oligodendroglial tumors. *J Neurooncol* 2004;70:161-81.

[15] Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C, Horstmann S, Jourde B, Fahey M, Schuler D, Probst-Hensch NM, Yasargil MG, Yonekawa Y, Lutolf UM, Kleihues P, Ohgaki H. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic

alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol* 2004;108:49-56.

[16] Reifenberger G, Louis DN. Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:111-26.

[17] Smith JS, Perry A, Borell TJ, Lee HK, O'Fallon J, Hosek SM, Kimmel D, Yates A, Burger PC, Scheithauer BW, Jenkins RB. Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol* 2000;18:636-45.

[18] Godfraind C, Rousseau E, Ruchoux MM, Scaravilli F, Vikkula M. Tumour necrosis and microvascular proliferation are associated with 9p deletion and CDKN2A alterations in 1p/19q-deleted oligodendrogliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2003;29:462-71.

[19] Iwamoto FM, Nicolardi L, Demopoulos A, Barbashina V, Salazar P, Rosenblum M, Hormigo A. Clinical relevance of 1p and 19q deletion for patients with WHO grade 2 and 3 gliomas. *J Neurooncol* 2008;88:293-8.

[20] Bouvier C, Roll P, Quilichini B, Metellus P, Calisti A, Gilles S, Chinot O, Fina F, Martin PM, Figarella-Branger D. Deletions of chromosomes 1p and 19q are detectable on frozen smears of gliomas by FISH: usefulness for stereotactic biopsies. *J Neurooncol* 2004;68:141-9.

[21] Perry A, Fuller CE, Banerjee R, Brat DJ, Scheithauer BW. Ancillary FISH analysis for 1p and 19q status: preliminary observations in 287 gliomas and oligodendroglioma mimics. *Front Biosci* 2003;8:a1-9.

- [22] Fuller CE, Schmidt RE, Roth KA, Burger PC, Scheithauer BW, Banerjee R, Trinkaus K, Lytle R, Perry A. Clinical utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in morphologically ambiguous gliomas with hybrid oligodendroglial/astrocytic features. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:1118-28.
- [23] Jeon YK, Park K, Park CK, Paek SH, Jung HW, Park SH. Chromosome 1p and 19q status and p53 and p16 expression patterns as prognostic indicators of oligodendroglial tumors: a clinicopathological study using fluorescence in situ hybridization. *Neuropathology* 2007;27:10-20.
- [24] Hamlat A, Saikali S, Chaperon J, Le Calve M, Gedouin D, Ben-Hassel M, Guegan Y. Oligodendroglioma: clinical study and survival analysis correlated with chromosomal anomalies. *Neurosurg Focus* 2005;19:E15.
- [25] Reddy KS. Assessment of 1p/19q deletions by fluorescence in situ hybridization in gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;184:77-86.
- [26] Cairncross JG, Macdonald DR. Successful chemotherapy for recurrent malignant oligodendroglioma. *Ann Neurol* 1988;23:360-4.
- [27] Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:497-511.
- [28] Drouin R, Therrien JP, Angers M, Ouellet S. In vivo DNA analysis. *Methods Mol Biol* 2001;148:175-219.
- [29] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. WHO classification of tumours of the central nervous system. 4th ed. World Health Organization Classification of Tumours. Geneva: WHO Press, 2007.

- [30] Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ, Pearl DK. Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer* 1997;79:1381-93.
- [31] Giannini C, Scheithauer BW, Weaver AL, Burger PC, Kros JM, Mork S, Graeber MB, Bauserman S, Buckner JC, Burton J, Riepe R, Tazelaar HD, Nascimento AG, Crotty T, Keeney GL, Pernicone P, Altermatt H. Oligodendrogliomas: reproducibility and prognostic value of histologic diagnosis and grading. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:248-62.
- [32] Kros JM, Gorlia T, Kouwenhoven MC, Zheng PP, Collins VP, Figarella-Branger D, Giangaspero F, Giannini C, Mokhtari K, Mork SJ, Paetau A, Reifenberger G, van den Bent MJ. Panel review of anaplastic oligodendroglioma from European Organization For Research and Treatment of Cancer Trial 26951: assessment of consensus in diagnosis, influence of 1p/19q loss, and correlations with outcome. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66:545-51.
- [33] Megyesi JF, Kachur E, Lee DH, Zlatescu MC, Betensky RA, Forsyth PA, Okada Y, Sasaki H, Mizoguchi M, Louis DN, Cairncross JG. Imaging correlates of molecular signatures in oligodendrogliomas. *Clin Cancer Res* 2004;10:4303-6.
- [34] Dehais C, Laigle-Donadey F, Marie Y, Kujas M, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, Pedretti M, Polivka M, Xuan KH, Thillet J, Delattre JY, Sanson M. Prognostic stratification of patients with anaplastic gliomas according to genetic profile. *Cancer* 2006;107:1891-7.
- [35] Nagasaka T, Gunji M, Hosokai N, Hayashi K, Ikeda H, Ito M, Inao S. FISH 1p/19q deletion/imbalance for molecular subclassification of glioblastoma. *Brain Tumor Pathol* 2007;24:1-5.

- [36] Kanner AA, Staugaitis SM, Castilla EA, Chernova O, Prayson RA, Vogelbaum MA, Stevens G, Peereboom D, Suh J, Lee SY, Tubbs RR, Barnett GH. The impact of genotype on outcome in oligodendroglioma: validation of the loss of chromosome arm 1p as an important factor in clinical decision making. *J Neurosurg* 2006;104:542-50.
- [37] Nutt CL. Molecular genetics of oligodendrogliomas: a model for improved clinical management in the field of neurooncology. *Neurosurg Focus* 2005;19:E2.
- [38] Bigner SH, Matthews MR, Rasheed BK, Wiltshire RN, Friedman HS, Friedman AH, Stenzel TT, Dawes DM, McLendon RE, Bigner DD. Molecular genetic aspects of oligodendrogliomas including analysis by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 1999;155:375-86.
- [39] Koschny R, Koschny T, Froster UG, Krupp W, Zuber MA. Comparative genomic hybridization in glioma: a meta-analysis of 509 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;135:147-59.
- [40] Bourdon V, Plessis G, Chapon F, Guarnieri J, Derlon JM, Jonveaux P. Chromosome imbalances in oligodendroglial tumors detected by comparative genomic hybridization. *Ann Genet* 2004;47:105-11.
- [41] Jeuken JW, Sprenger SH, Boerman RH, von Deimling A, Teepen HL, van Overbeeke JJ, Wesseling P. Subtyping of oligo-astrocytic tumours by comparative genomic hybridization. *J Pathol* 2001;194:81-7.
- [42] Cowell JK, Barnett GH, Nowak NJ. Characterization of the 1p/19q chromosomal loss in oligodendrogliomas using comparative genomic hybridization arrays (CGHa). *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:151-8.

- [43] Kitange G, Misra A, Law M, Passe S, Kollmeyer TM, Maurer M, Ballman K, Feuerstein BG, Jenkins RB. Chromosomal imbalances detected by array comparative genomic hybridization in human oligodendrogliomas and mixed oligoastrocytomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;42:68-77.
- [44] Scheie D, Andresen PA, Cvancarova M, Bo AS, Helseth E, Skullerud K, Beiske K. Fluorescence in situ hybridization (FISH) on touch preparations: a reliable method for detecting loss of heterozygosity at 1p and 19q in oligodendroglial tumors. *Am J Surg Pathol* 2006;30:828-37.
- [45] Fallon KB, Palmer CA, Roth KA, Nabors LB, Wang W, Carpenter M, Banerjee R, Forsyth P, Rich K, Perry A. Prognostic value of 1p, 19q, 9p, 10q, and EGFR-FISH analyses in recurrent oligodendrogliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:314-22.
- [46] Ino Y, Betensky RA, Zlatescu MC, Sasaki H, Macdonald DR, Stemmer-Rachamimov AO, Ramsay DA, Cairncross JG, Louis DN. Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis. *Clin Cancer Res* 2001;7:839-45.
- [47] Hashimoto N, Murakami M, Takahashi Y, Fujimoto M, Inazawa J, Mineura K. Correlation between genetic alteration and long-term clinical outcome of patients with oligodendroglial tumors, with identification of a consistent region of deletion on chromosome arm 1p. *Cancer* 2003;97:2254-61.
- [48] Hartmann C, Mueller W, von Deimling A. Pathology and molecular genetics of oligodendroglial tumors. *J Mol Med* 2004;82:638-55.
- [49] Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, Flynn H, Passe S, Felten S, Brown PD, Shaw EG, Buckner JC. A t(1;19)(q10;p10)

mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res* 2006;66:9852-61.

[50] Griffin CA, Burger P, Morsberger L, Yonescu R, Swierczynski S, Weingart JD, Murphy KM. Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65:988-94.

Résumé:

Introduction: Les délétions 1p et 19q ont été décrites dans les oligoastrocytomes et dans les oligodendrogliomes. Ces délétions résultent de la translocation entre ces deux chromosomes. Dans très peu de cas où la délétion 1p seule a été décrite, son mécanisme de survenue reste inconnu. Nous rapportons ici un premier cas d'oligoastrocytome dans lequel la délétion 1p seule a été détectée et a été associée à la translocation entre les chromosomes 1 et 7.

Matériels et Méthodes: Des spécimens chirurgicaux frais ont été collectés durant l'opération et immédiatement après resection chirurgicale au bloc opératoire. L'échantillon a été utilisé pour la culture cellulaire, la confection de lames par empreintes cellulaires et l'extraction d'ADN. Du sang veineux a été prélevé chez ce patient 24 heures après chirurgie. Le marquage en bande G (GTG) et le caryotype ont été faits et les 1p/19q, *TP53*, *PTEN*, et *c-MYC* ont été analysés par hybridation in situ observée en fluorescence (FISH). La technique multicolore FISH (MFISH) et l'analyse des microsatellites ont été aussi mises en œuvre pour caractériser le cas.

Résultats: Une translocation chromosomique non-équilibrée a été trouvée dans toutes les métaphases et a été confirmée par MFISH. Le caryotype du cas pourrait être indiqué: **50~99,XXX,+der(1;7)(q10;p10),inc[cp47]**. Le chromosome dérivé a été trouvé dans toutes les 47 cellules analysées, mais le nombre de dérivés varie de 1 à 4. Il n'y a pas eu ni de déséquilibre dans le nombre de copies des gènes *TP53* et *PTEN* comparativement à leur centromère respectif utilisé comme contrôle, ni

d'amplification du gène *c-MYC*. Nous n'avions pas retrouvé de perte d'hétérozygotie sur 1p et 19q des cellules tumorales.

Conclusion: Nos résultats montrent une translocation entre les chromosomes 1 et 7 qui a possiblement conduit à la délétion 1p seule dans ce cas d'oligoastrocytome. Ceci suggère que cette translocation entre les chromosomes 1 et 7 pourrait avoir causé la délétion 1p. Cette translocation combinée avec la polyploidie de la tumeur pointent une voie alternative d'inhibition d'un gène suppresseur de tumeur situé sur le chromosome 1 et l'amplification d'un oncogène sur le chromosome 7.

Mots clés : oligodendrogliome, oligoastrocytome, translocation chromosomique, gliomes, der(1;7), délétion 1p/19q

Ma contribution: J'ai fait le design expérimental et planifié toutes les expériences. J'ai effectué toutes les manipulations qui ont conduit à cet article. J'ai écrit une première version complète de cet article. Cet article contient 4 figures, j'en ai conçu 3 et la 4^{ième} a été conçue par la Dre Tsanaclis.

A new der(1;7)(q10;p10) leading to a singular 1p loss in a case of anaplastic oligoastrocytoma

Macoura GADJI¹, Ana-Maria CROUS-TSANACLIS², David
MATHIEU³, David FORTIN^{3*}, Régen DROUIN^{1*}

1- Division of Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, 3001 12th Avenue North, Sherbrooke, QC J1H 5N4, Canada

2- Department of Pathology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC J1H 5N4, Canada

3- Division of Neurosurgery, Department of Surgery, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC J1H 5N4, Canada

Running title: A new der(1;7) in anaplastic oligoastrocytoma

Key words: oligodendroglioma, oligoastrocytoma, chromosome translocation, gliomas, der(1;7), 1p/19q deletion

This study was funded in part by a grant from the Canada Research Chairs Program to R.D. M.G. received support from the Department of Public Health (MSP) and the National Center for Blood Transfusions (CNTS) of Senegal, and from the Foundation for Research on Children's Diseases. D.F. holds the National Bank of Canada Chair for the Treatment of Brain Cancer and R.D. the Canada Research Chair in "Genetics, Mutagenesis and Cancer".

Introduction: 1p and 19q deletions have been described in oligoastrocytomas and oligodendrogliomas. These deletions originate from translocation between the two chromosomes. In the few cases where only the 1p deletion was described, the mechanism remains unknown. We report a first case of oligoastrocytoma in which a single 1p deletion was detected and was linked to translocation between chromosomes 1 and 7.

Materials and Methods: Fresh surgical specimens were collected during biopsy immediately after resection in the operating room. The sample was used for cell

culture, touch preparation smear slides, and DNA extraction. Peripheral venous blood was collected from the patient one day after the surgery. GTG banding and karyotyping were performed and 1p/19q, TP53, PTEN, and c-MYC were analyzed by fluorescent in situ hybridization (FISH). Multicolor FISH (mFISH) and microsatellite analyses were also performed.

Results: An unbalanced chromosomal translocation was found in all metaphases confirmed by mFISH. The karyotype of the case could be indicated: **50~99,XXX,+der(1;7)(q10;p10),inc[cp47]**. The derivative chromosome was found in all 47 analyzed cells, but the number of derivatives varies from one to four. There was neither imbalance in copy number for genes TP53 and PTEN compared to their centromere control, nor amplification of the c-MYC gene. We did not find loss of heterozygosity for 1p and 19q in tumor cells.

Conclusion: Our results show that a translocation between chromosomes 1 and 7 led to a singular 1p deletion in this oligoastrocytoma. This suggests that translocation between chromosomes 1 and 7 may have caused 1p and 7q deletion. This translocation combined with tumor polyploidy thus points to an alternative way of both inhibiting a tumor suppressor gene located in chromosome 1 and amplifying an oncogene in chromosome 7.

Introduction

Oligoastrocytomas are infiltrating gliomas composed of a variable mixture of neoplastic astrocytes and oligodendrocytes. Combined loss of chromosomes 1p and 19q was described in 30-50% of these tumors (11, 12, 14, 19), and the mechanisms of these losses are thought to be similar to those in oligodendroglioma. Other genetic alterations included mutations of the TP53 gene, found in 30% of cases (19). These alterations seem to be exclusive, i.e., tumors with deletion of 1p/19q do not exhibit mutations of the TP53 gene and vice versa, implying a clonality of these neoplasms (19). As for oligodendrogliomas, combined 1p/19q loss is associated with better response to chemotherapeutic treatment and prognosis. However, this 1p⁻/19q⁻ is occasionally encountered in other glioma subtypes, both individually and in combination (17). Very few oligodendrogliomas lack the deletion, and when they do, patient survival is typically shorter (7,17), which casts doubt on the true oligodendroglial nature of the lesion (6). Using cytogenetic techniques of cultured low-grade oligodendroglial tumors, the mechanism of combined 1p⁻/19q⁻ was found to be linked to an unbalanced translocation t(1;19)(q10;p10) (9,10). Further analyses by using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) on paraffin embedded samples suggested that in 91% of the tumors, the combined 1p⁻/19q⁻ was mediated by this translocation, whereas the translocation was also found in 12% of tumors without 1p⁻/19q⁻ (10). These findings of a possible mechanism for 1p⁻/19q⁻ support the potential of 1p⁻/19q⁻ as a valid diagnostic tool for classic oligodendroglioma. However, this chromosomal mechanism does not explain the singular 1p arm deletion found in a few oligodendrogliomas or oligoastrocytomas. Here, we report

the first case of a singular 1p arm deletion in an oligoastrocytoma generated by an alternative translocation between chromosome 1 and chromosome 7.

Clinical Report

A 32-year old female presented with a progressive frontal headache over 3 weeks. One week prior to admission, she complained of a gradual sensorimotor deficit involving the left side of her body. This deficit rapidly produced loss of balance and incapacity to walk. The patient also noticed a short term memory deficit, as well as a left visual field deficit. Upon investigation, the MRI revealed a 6.2 X 4.1 X 4.4 cm mass localized in the right thalamus. This large lesion produced a significant mass effect by protruding in the lateral and third ventricles and triggered a midline shift. In the rostro-caudal plane, the tumor extended from the lateral ventricle down to the midbrain. There was a patchy enhancement on contrast-enhanced T1 sequences. Sub-total surgical resection was performed with excision of 50% of the mass. The histopathological diagnosis was of an anaplastic oligoastrocytoma. The patient's neurological condition remained unchanged in the immediate post-operative period. She was transferred to her local institution for radiation therapy combined with temozolomide. However, 1 week after the transfer, she developed a comatose state that was attributable to hydrocephalus secondary to third ventricle obstruction. She was treated with the insertion of a shunt. Radiotherapy was initiated 3 weeks after shunt insertion, and the patient continued to deteriorate to a lethargic condition, so that 1 week after the beginning of radiation all treatments were discontinued and the patient was oriented toward palliative care. The patient expired less than 3 months

after first symptoms.

Materials and Methods

Samples

This sample was acquired in the context of a clinical study that received approval by the research ethics board for research with human subjects at the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS). Written informed consent was obtained from the patient prior to surgery. Biopsy samples were obtained during resection in the operating room. Tumor fragments for cell culture, for touch preparation smear slides (TP slides), and for tumoral DNA extraction were collected. Peripheral venous blood and saliva samples were collected for constitutional DNA extraction.

Histopathological diagnosis

After surgical removal, fragments of tumor were fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin. Three-micrometer sections were stained with hematoxylin and eosin and submitted to immunohistochemical reactions for the detection of glial fibrillary acidic protein, neurofilaments, and synaptophysin. Additional sections were submitted for Ki-67 antibody staining (all antibodies from DAKO, Carpinteria, USA) to evaluate the proliferative index. Tumor vascularization and the degree of microvascular proliferation were evaluated with

CD31 antibody (DAKO, Carpinteria, USA). Diagnosis and grading were established according to WHO criteria (13).

Conventional cytogenetic analysis

Fragments of tumor were cut in small pieces, placed in Petri dishes (T25) (Sarstedt Inc., Newton, NC, USA), and cultured in a DMEM X1 (Wisent Inc. St-Bruno, Quebec, Canada) complemented with 10% fetal bovine sera (Wisent) and 1% (vol/vol) antimycotic – penicillin-streptomycin (Wisent). Two to three weeks later, the Petri dishes were confluent and the cells were passed into bigger dishes (T75) (Sarstedt). When the dishes were 80% confluent, Colcemid (Invitrogen, GIBCO, Carlsbad, CA, USA) was added for 17 hours. The cells were then washed with HBSSx1, detached with trypsin (Wisent), and retrieved in a 15-mL Falcon tube (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). After centrifugation at 1700 g per 7 minutes, the pellet was resuspended in an 8% sodium citrate hypotonic solution and incubated at 37°C for 45 minutes. Pre-fixation by adding 1 mL of 5% acetic acid was done followed by centrifugation at 1700 g per 7 minutes. Finally, three time fixations for 10 minutes each were performed with Carnoy (3:1 methanol-glacial acetic acid by volume). Then the fixed cells and metaphases were spread on slides in a Thermotron environmental control unit (CDS-5, Thermotron, Amsterdam, Holland) with T° 22°C and humidity 35%. G-banding using trypsin and colored with Giemsa (GTG-banding) was performed prior to karyotyping.

Molecular cytogenetic analysis

The TP slides were performed by smearing a core biopsy onto a glass and letting it air-dry (6). The TP slides were fixed using Carnoy (3:1 methanol-glacial acetic acid by volume) and air-dried overnight into a chemical hood and stored at -20°C until used for FISH. FISH was performed using LSI 1p36/1q25 – LSI 19q13/19p13 dual color probe sets (6), LSI PTEN (Spectrum Orange)/CEP 10 (Spectrum Green), LSI TP53 (Spectrum Orange)/CEP 17 (Spectrum Green), and LSI c-myc (Spectrum Orange), following the manufacturer's protocol (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA). MFISH (multicolored FISH) was performed with MetaSystems' 24 XCyte 24-color kit (MetaSystems GmbH, Altussheim, Germany) according to the manufacturer's protocol to recover all chromosomal abnormalities.

FISH analysis

An average of 200 nuclei per slide were scored in the FISH analysis. Only the non-overlapping, morphologically well-preserved nuclei were included in the analysis for TP slides. For each cell, the ratio between the paired probes on chromosomes 1 and 19 was analyzed. The green signal in the probes used served as a control and the deletion per nucleus showed that the number of green signals was higher than the red signals. A case was considered to have 1p or 19q deleted when the scored nuclei displayed an imbalance between green and red signals (6). For PTEN and TP53 the red signals were scored per nucleus comparatively to the green signal centromeric controls. For c-myc the red signals per nucleus were evaluated in order to detect amplification.

Image acquisition

Each slide was examined using an Olympus BX61 microscope equipped with appropriate filters at a 1x1000 magnification. The pictures of selected cells were taken using a Compulog IMAC-CCD S30 video camera module and were analyzed using the *in situ* imaging system (ISIS 2) software version 2.5 (MetaSystems Inc, Belmont, MA).

Molecular genetic analysis

Analysis of loss of heterozygosity (LOH) was performed by carrying out PCR amplification of constitutional and tumoral DNA with specific microsatellite markers for chromosomes 1 and 19, and then performing a size-fragment separation in a 6% polyacrylamide gel. Ten polymorphic microsatellite markers were chosen for chromosome 1 (8 test markers on p-arm and 2 control markers on q-arm): D1S2795 (1p36.31), D1S2666 (1p36.23), D1S244 (1p36.22), D1S2676 (1p34.3), D1S2729 (1p34.3), D1S2722 (1p34.2), D1S508 (1p36.31-p36.21), D1S2734 (1p35.36), D1S252 (1q21), D1S2346 (1q22) (IDT Inc, Coralville, USA). Ten polymorphic microsatellite markers were also chosen for chromosome 19 (9 test markers on q-arm and 1 control marker on p-arm: D19S412 (19q13.32), D19S559 (19q13.32), D19S200 (19q13.2), D19S397 (19q13.14), D19S422 (19q13.13), D19S425 (19q13.12), D19S416 (19q13.11), D19S112 (19q13.3), D19S556 (19p13.13)) (IDT Inc, Coralville, USA). The PCR reaction program has already been described elsewhere (6).

Paired blood and tumor samples were analyzed for LOH using 19 microsatellite markers. An absence of intensity or a significant reduction in intensity (more than 50%) in the tumor lane compared to the corresponding blood and saliva lanes was scored as LOH.

Results

Pathological diagnosis

Microscopic examination disclosed a tumor composed of an admixture of oligodendroglial and astrocytic tumor cells (Figure 1). The oligodendroglial component consisted of cells with pleomorphic nuclei centered in an apparently empty space. The astrocytic component disclosed a moderate nuclear pleomorphism, the ill-delimited cytoplasm merged with the fibrillary stroma of this part of the tumor (Figure 1). There were 10 mitoses per hpf. Small necrotic areas were identified. Microvascular proliferation was conspicuous. Both types of cells were positive for antibody anti-GFAP. The proliferative index was 30%. According to the WHO criteria, the tumor was classified as anaplastic oligoastrocytoma.

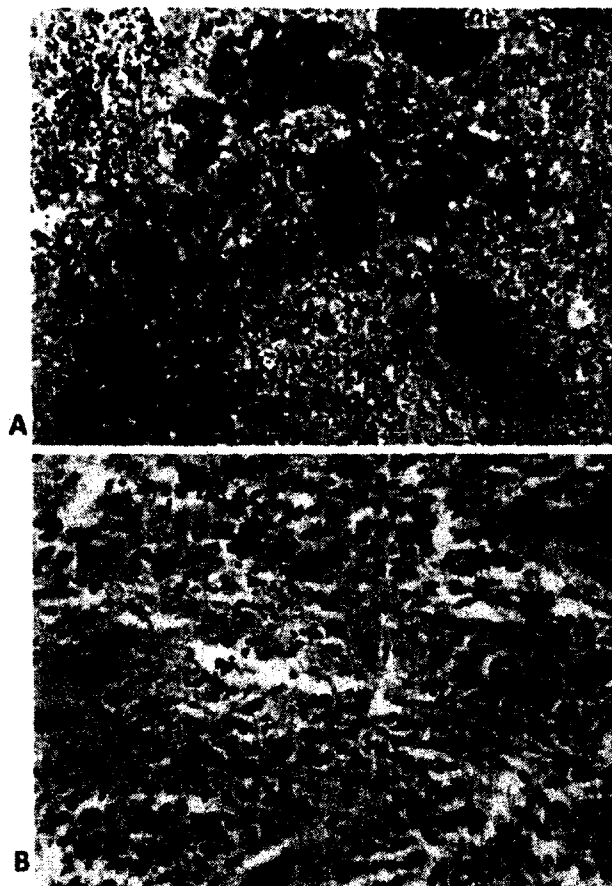


Figure 1

Figure 1: Different sections of the tumor showing the characteristic aspect of an oligodendroglioma (A) and the astrocytic component (B). Note the extensive microvascular proliferation in A. Hematoxylin and eosin. (400 X original magnification.)

Cytogenetic findings

Twenty-two metaphases were analyzed and karyotyped by GTG-banding. Tumoral karyotypes by GTG-banding revealed a female karyotype with polyploidization. The chromosome number ranges from 50 to 99, with chromosomes varying between hyperdiploidy and hypertetraploidy. The chromosomal translocation was confirmed by analyzing 25 additional metaphases by mFISH (Figure 2). MFISH confirmed the translocation between chromosome 1 and chromosome 7 and the polyploidization of the tumor (Figure 2). All of the 47 metaphases analyzed displayed the derivative chromosome, between one to four derivatives per cell, suggesting that this translocation was indeed present in 100% of the cells composing the tumor. The number of apparently normal chromosome 7 is the highest of all chromosomes in nearly all cells. Each metaphase had a different karyotype, therefore no clone was observed. The tumoral karyotype could be written: **50~99,XXX,+der(1;7)(q10;p10),inc[cp47]**

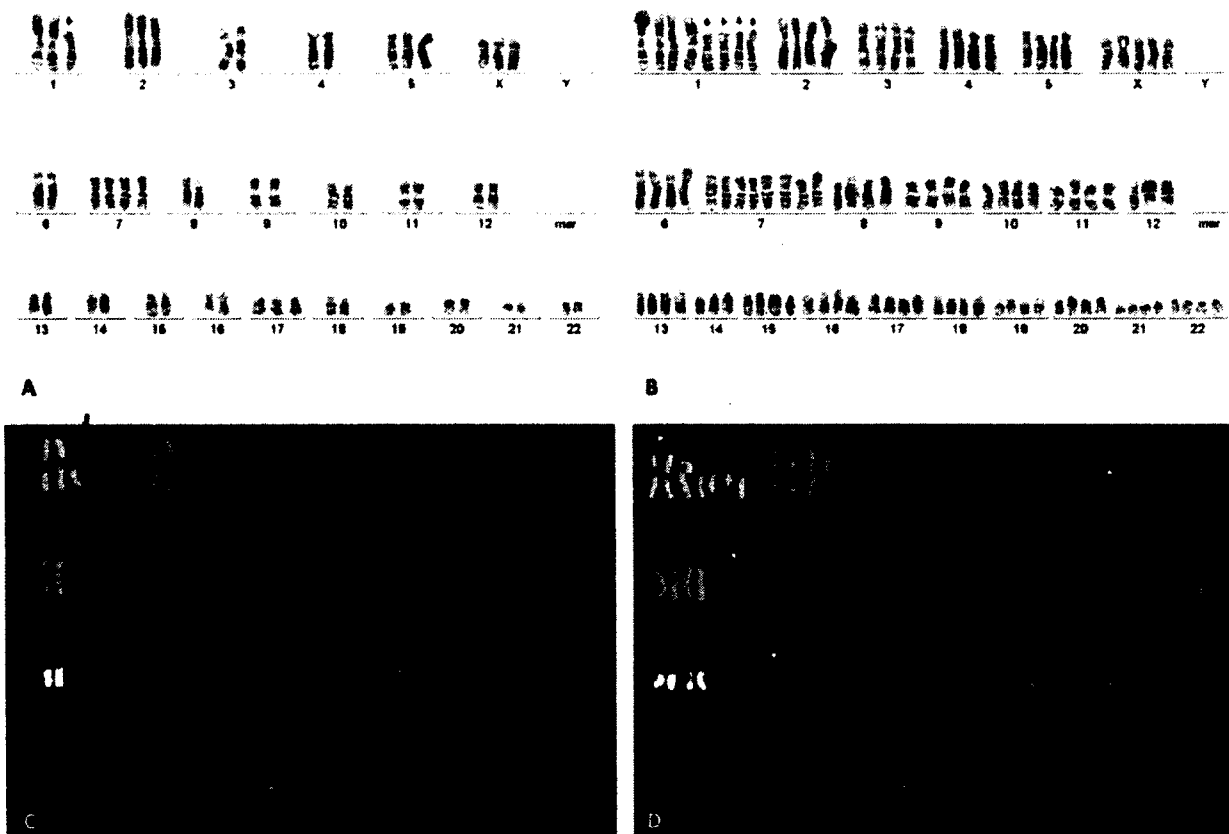


Figure 2: GTG-Karyotypes (A, B) and mFISH (C, D) with MetaSystems 24 XCyte 24-color kit on metaphases of the tumor showing the translocation between chromosomes 1 and 7: $der(1;7)(q10;p10)$ indicated by black (A, B) and red (C, D) arrows. The white arrows (C, D) indicate overlapping chromosomes in spread metaphases.

Molecular cytogenetic findings

FISH analysis for chromosomes 1 and 19 (1p-/19q-) revealed a signal imbalance between the target loci (Spectrum orange) vs. the control locus (Spectrum green) for chromosome 1, and no such signal imbalance for chromosome 19. No imbalance of copy number compared to the centromeric control was noted with PTEN or TP53; nor was c-MYC amplification noted (Figure 3). The study of these genes also suggests a polyploidization of the tumor, as revealed by GTG-banding and mFISH.

Molecular genetic findings

Microsatellite analysis did not show any deleted marker due to marked polyploidy of the tumor. (Data not shown.)

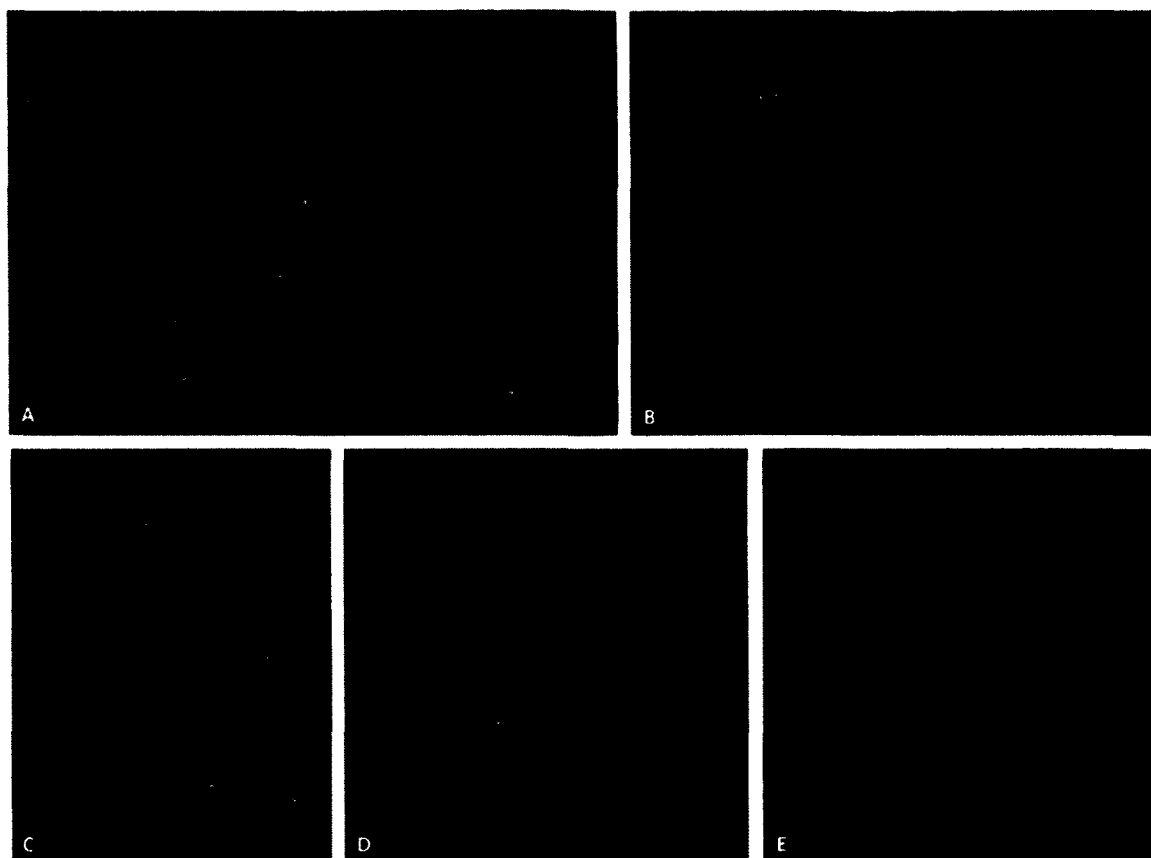


Figure 3

Figure 3: FISH using: (A) LSI 1p36/1q25 and (B) LSI 19q13/ 19p13 - dual-color probe sets; (C) LSI TP53 (Spectrum Orange)/CEP 17 (Spectrum Green); (D) LSI PTEN (Spectrum Orange)/CEP 10 (Spectrum Green); and (E) LSI c-MYC (Spectrum Orange); on touch preparation slides of the tumor.

Discussion

This clinical case in a young patient depicted an unusually aggressive behavior, with a fulminant progression as this unfortunate patient expired less than 3 months after initial clinical presentation. In our previous study on oligodendroglial tumors (6), we found that oligoastrocytic tumors presented an adverse prognosis compared to pure oligodendroglial tumors. Even though this oligoastrocytic entity remains controversial for many authors, it is generally recognized that patients' prognosis is somewhat negatively affected compared to pure oligodendroglial tumors. The more negative prognosis can be explained in part by the deep-seated location of the tumor, with a precocious alteration of CSF drainage and secondary hydrocephalus. However, even with adequate treatment of this complication and initiation of radiotherapy, the patient nonetheless presented an unremitting progression of the tumor, suggesting that tumor biological factors also accounted for the adverse prognosis.

It is generally acknowledged that combined 1p and 19q deletion is a predictive and prognostic biomarker of oligoastrocytomas as well as of oligodendrogliomas. Furthermore, this chromosomal and molecular signature is increasingly being recognized as a diagnostic biomarker of pure oligodendrogliomas (6), a view reinforced by the discovery of the translocation between chromosomes 1 and 19 as the chromosomal mechanism generating these deletions (9,10). However, in some oligodendroglial or mixed tumor cases, isolated 1p deletion is observed and it is as yet unknown how this singular deletion occurs in oligoastrocytomas. In this report,

we describe for the first time an alternative translocation between chromosomes 1 and 7, leading to this singular 1p deletion as the chromosomal mechanism in an oligoastrocytoma. The 1p deletion is associated with a number of human malignancies, suggesting the existence of cancer-related genes on 1p (15). The deletion on chromosome 1p spans the entire short arm (2, 16), which covers 120 Mb (8) and therefore contains a vast number of potential tumor suppressor genes (TSG). Molecular studies have mapped the deletion region to 1p36 in most cases. This telomeric 1p has been found to be a deletion target in malignancies of various lineages, including those of neural, hematopoietic, and epithelial origins, and was thus recognized as a deletion hotspot. The mechanism of this deletion is still not understood. (1). The most common chromosomal arm involved in whole-arm translocation in cancer is 1q, and its most common partner is chromosome 7 (followed by chromosome 16), forming the derivative der(1;7) and accounting for the frequent deletion of chromosome 1p in cancer (9). Chromosome 7 contains the EGFR gene, which is frequently amplified in 50% of gliomas (5). Thus, the der(1;7) might explain a mechanism by which the tumor suppresses potential TSG located on chromosome 1 while producing an amplification of an oncogene (EGFR) located on chromosome 7. This case presented a polyploidization of the tumor, which typically is a factor of malignancy in cancer. This is in line with the severity of the evolution of the case. This centromeric fusion may illustrate the rule of the centromeric NOTCH2 gene, which is a predictor of longer survival in subtypes of oligodendrogliomas and glioblastomas (3). The chromosome centromere contains a pericentric duplication consisting of a 150-kb sequence originating from the 1p11 region duplicated into the 1q21 region (4). The chromosome 1 centromere is

surrounded by duplicate sequences going in opposite directions, leading to a new N-terminal of the NOTCH2 gene (4). Genomic duplication with a high degree of sequence conservation might render a genetic locus susceptible to homologous recombination or translocations (18). This may explain why chromosome 1 is frequently implicated in chromosomal translocations in tumors.

Conclusion

Our study hints at how singular 1p arm deletion could be generated in gliomas by a translocation mechanism between chromosomes 1 and 7. This result, combined with results from previous studies explaining the mechanism of 1p⁻/19q⁻ deletions generated by a translocation between 1p and 19q, sheds some light on the molecular mechanism leading to this chromosomal signature of oligodendrogliomas. This case report also presents a mechanism by which a tumor knocks down a tumor suppressor gene while amplifying an oncogene via chromosome translocation. However, these chromosomal translocations might explain only whole-arms deletion, while the mechanism by which interstitial and terminal deletions occurs in 1p and 19q deletions in oligodendrogliomas remains to be elucidated.

Aknowledgments

The authors are grateful to Ms. Rina Kampeas for careful editing of the manuscript and important comments and to Marie Boudrias for her excellent technical help. This study was supported in part by a grant from the Canada Research Chairs Program to R.D. M.G. received support from the Department of Public Health

(MSP) and the National Center for Blood Transfusions (CNTS) of Senegal, and from the Foundation for Research on Children's Diseases. D.F. holds the National Bank of Canada Chair for the Treatment of Brain Cancer and R.D. the Canada Research Chair in "Genetics, Mutagenesis and Cancer".

References

1. Bagchi A, Mills AA. The quest for the 1p36 tumor suppressor. *Cancer Res.* 2008;68:2551-2556.
2. Bigner SH, Matthews MR, Rasheed BK, et al. Molecular genetic aspects of oligodendrogliomas including analysis by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol.* 1999;155:375-386.
3. Boulay JS, Merlo A. Value of 1p/19q and other LOH Markers for Brain Tumor Diagnosis, Prognosis, and Therapy. In: Meir EGV, ed. *CNS Cancer, Cancer Drug Discovery and development.* New-York: Humana Press; 2009:359-372.
4. Duan Z, Li FQ, Wechsler J, et al. A novel notch protein, N2N, targeted by neutrophil elastase and implicated in hereditary neutropenia. *Mol Cell Biol.* 2004;24:58-70.
5. Gadji M, Crous AM, Fortin D, et al. EGF receptor inhibitors in the treatment of glioblastoma multiform: Old clinical allies and newly emerging therapeutic concepts. *Eur J Pharmacol.* 2009;625:23-30.
6. Gadji M, Fortin D, Tsanaclis AM, et al. Is the 1p/19q deletion a diagnostic marker of oligodendrogliomas? *Cancer Genet Cytogenet.* 2009;194:12-22.
7. Giannini C, Burger PC, Berkey BA, et al. Anaplastic oligodendroglial tumors: refining the correlation among histopathology, 1p 19q deletion and clinical

outcome in Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *Brain Pathol.* 2008;18:360-369.

8. Gregory SG, Barlow KF, McLay KE, et al. The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature.* 2006;441:315-321.

9. Griffin CA, Burger P, Morsberger L, et al. Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65:988-994.

10. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res.* 2006;66:9852-9861.

11. Jeuken JW, von Deimling A, Wesseling P. Molecular pathogenesis of oligodendroglial tumors. *J Neurooncol.* 2004;70:161-181.

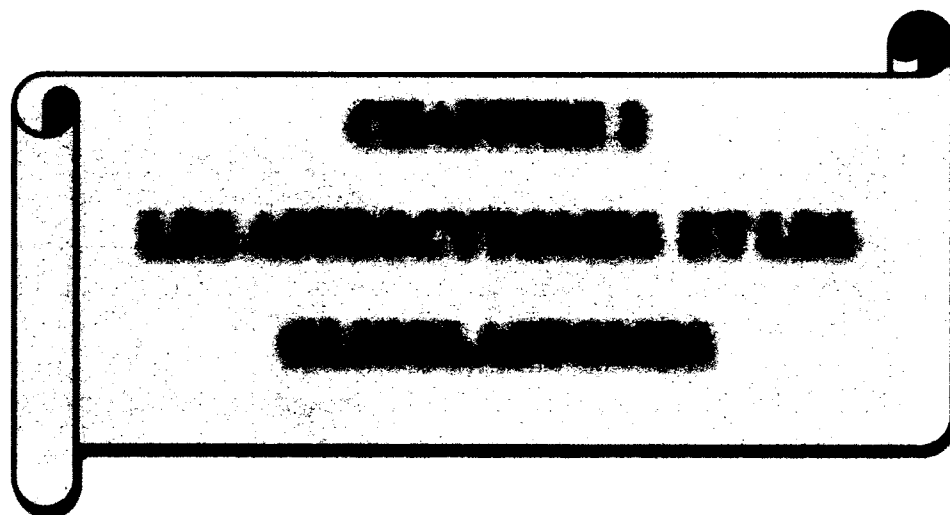
12. Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C, et al. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol.* 2004;108:49-56.

13. Reifenberger G, Kros JM, Louis DN, et al. Oligodendrogliomas. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiesler OD, et al., eds. *WHO classification of Tumors Geneva*: WHO press; 2007:54-60.

14. Reifenberger G, Louis DN. Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003;62:111-126.

15. Schwab M, Praml C, Amler LC. Genomic instability in 1p and human malignancies. *Genes Chromosomes Cancer.* 1996;16:211-229.

16. Smith JS, Alderete B, Minn Y, et al. Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene*. 1999;18:4144-4152.
17. Smith JS, Perry A, Borell TJ, et al. Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol*. 2000;18:636-645.
18. Turner DJ, Miretti M, Rajan D, et al. Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. *Nat Genet*. 2008;40:90-95.
19. Ueki K, Nishikawa R, Nakazato Y, et al. Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors. *Clin Cancer Res*. 2002;8:196-201.



ARTICLE 1**AVANT-PROPOS**

Three-dimensional (3D) nuclear telomere architecture is associated with differential time to progression and overall survival in glioblastoma patients

Article publié dans la revue Neoplasia Volume 12 Number 2 February 2010 pp.

183–191

Macoura GADJI^{1,2}, David FORTIN³, Ana-Maria TSANACLIS⁴, Yuval GARINI⁵,
Nir KATZIR⁶, Yifat WIENBURG⁶, Ju YAN¹, Ludger KLEWES², Thomas
KLONISCH⁷, Régen DROUIN^{1*} and Sabine MAI^{2*}

Résumé :

L'absence de marqueurs biologiques permettant la détermination de l'évolution clinique et du pronostic des glioblastomes (GBM) est un obstacle majeur au management clinique des individus souffrant de cette maladie dévastatrice. La variabilité observée dans les réponses aux traitements des patients et de leur devenir clinique implique une hétérogénéité biologique et l'existence de catégories de patients non identifiées. Ici nous définissons pour la première fois 3 catégories de patients souffrant de GBM avec une architecture 3D télomérique nucléaire distincte et cliniquement prédictive qui est définie par le nombre de télomères et la fréquence des agrégats télomériques. Nous avons appliqué l'analyse par QFISH (quantitative, hybridation in situ observée en fluorescence) en trois dimensions des télomères dans chaque échantillon avec 2 outils indépendants de mesure des télomères [programme TeloViewTM (p_1) et programme SpotScan (p_2)]. En se basant sur ces mesures en 3D-FISH, nous avons identifiées 3 catégories de patients (catégories I-III) dans notre cohorte de patients atteints de GBM, montrant des différences significatives à travers trois paramètres : Nombre de télomères/noyaux ($p_1 = 0.0275$; $p_2 = <0.0001$), la longueur des télomères (p_1 and $p_2 = 0.0275$), et le nombre d'agrégats télomériques ($p_1 = 0.0464$; $p_2 = <0.0001$). Les trois catégories correspondraient respectivement aux patients avec un temps de survie long, intermédiaire et aussi court ($p = 0.0393$). L'analyse du temps de progression montre aussi des différences significatives entre les 3 catégories de patients ($p = 0.0167$). Il y a une corrélation nette entre le temps de progression, la survie médiane et l'architecture nucléaire.

Les résultats de notre étude permettent d'établir qu'il y a un lien direct entre le devenir du patient et l'organisation nucléaire en 3D des télomères. Ils éclairent le pouvoir clinique de l'architecture télomérique comme un nouveau marqueur pronostique, prédictif et peut-être pharmacodynamique des GBM. En plus, la nouvelle méthode à haut débit que nous avons développée et introduite ici permet de balayer et analyser rapidement jusqu'à 300 noyaux en 20 minutes. Cette méthode peut être appliquée à n'importe quel type cellulaire et à n'importe quel type d'application d'un scanner.

Mots clés : télomères, organisation nucléaire en 3D, glioblastome, gliomes

Ma contribution : J'ai fait le design expérimental et planifié toutes les expériences. J'ai effectué toutes les manipulations qui ont conduit à cet article. J'ai écrit une première version complète de cet article. J'ai écrits les réponses aux commentaires des évaluateurs. Cet article contient 1 tableau et 5 figures que j'ai conçus. Yuval GARINI (compagnie) a mis au point le programme TeloView, Yifat WIENBURG (compagnie) et Nir KATZIR ont mis au point le program TeloScan; Ludger KLEWES est responsable de la technique TeloScan et nous avons travaillé ensemble pour utiliser cet outil avec mes échantillons.

**Three-dimensional (3D) nuclear telomere
architecture is associated with differential time to
progression and overall survival in glioblastoma
patients**

Macoura GADJI^{1,2}, David FORTIN³, Ana-Maria TSANACLIS⁴, Yuval GARINI⁵,
Nir KATZIR⁶, Yifat WIENBURG⁶, Ju YAN¹, Ludger KLEWES², Thomas
KLONISCH⁷, Régen DROUIN^{1*} and Sabine MAI^{2*}

1: Division of Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health
Sciences, Université de Sherbrooke, 3001 – 12th Avenue North, Sherbrooke,
QC J1H 5N4, Canada

2: Manitoba Institute of Cell Biology, CancerCare Manitoba, University of
Manitoba, 675 McDermot Avenue, Winnipeg, MB R3E 0V9. Canada

3: Division of Neurosurgery, Department of Surgery, Faculty of Medicine and
Health Sciences, Université de Sherbrooke, 3001 – 12th Avenue North,
Sherbrooke, QC J1H 5N4, Canada

4: Department of Pathology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université
de Sherbrooke, 3001 – 12th Avenue North, Sherbrooke, QC J1H 5N4, Canada

5: Department of Physics and Nanotechnology, Bar Ilan University, Ramat Gan,
Israel

6: Applied Spectral Imaging, Midgal HaEmek, Israel

7: Department of Human Anatomy and Cell Science, University of Manitoba, 130-
745 Bannatyne Avenue, Winnipeg, MB R3E 0J9, Canada

Running title: Telomere signatures in glioblastoma

Keywords: telomeres, 3D nuclear organization, 3D molecular imaging,
glioblastoma, gliomas

Dr. Régen Drouin

Division of Genetics

Department of Pediatrics

Faculty of Medicine and Health Sciences

Université de Sherbrooke,

3001 12th Avenue North,

Sherbrooke, QC J1H 5N4, Canada

Abstract

The absence of biological markers allowing for the assessment of the evolution and prognosis of glioblastoma (GBM) is a major impediment to the clinical management of individuals with this devastating disease. The observed variability in patients' responses to treatment and in outcomes implies biological heterogeneity and the existence of as of yet unidentified patient categories. Here we define for the first time three GBM patient categories with distinct and clinically predictive 3D nuclear-telomeric architecture defined by telomere number and frequency of telomeric aggregates.

We performed three-dimensional fluorescent *in situ* hybridization (3D-FISH) analyses of telomeres in each sample with two independent 3D telomere-measurement tools [TeloViewTM program (p_1) and SpotScan system (p_2)]. Based on these 3D-FISH measurements, we identified three patient categories (categories I-III) within our GBM patient cohort, displaying significant differences along three parameters: telomere numbers/nucleus ($p_1 = 0.0275$; $p_2 = <0.0001$), telomere length (p_1 and $p_2 = 0.0275$), and number of telomeric aggregates ($p_1 = 0.0464$; $p_2 = <0.0001$). The three categories corresponded to patients with long-term, intermediate, and short-term survival, respectively ($p = 0.0393$). The time to progression analyses also showed significant differences between the three

categories of patients ($p = 0.0167$). There was a correlation between time to progression, median survival and nuclear telomere architecture. The results of our study suggest that there is a direct link between patient outcome and 3D nuclear-telomere organization and as such highlight the clinical power of telomere signatures as a new prognostic, predictive, and potentially pharmacodynamic biomarker in GBM. In addition, the new automated 3D high-throughput method we developed and introduce here permits to quickly scan slides and analyze up to 300 nuclei in 20 minutes. This method can be applied to any cell type and scanning application.

Introduction:

Glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive primary malignant astrocytic brain tumor in adults [1]. Despite decades of experimentation with a view to improving outcomes for patients with this disease, GBM remains fatal, with a median survival of about 12 to 15 months [2]. Glioblastoma is associated with one of the worst five-year survival rates among all human cancers [3]. Interestingly, however, patients with one type of GBM, dubbed 'GBM with long term survival', survive for more than 36 months, a fact that highlights the biological heterogeneity of this disease [3].

Recent molecular studies have enhanced our understanding of the molecular pathogenesis of GBM. Glioblastomas may develop as primary or type I GBM, with epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification, or evolve from a low-grade diffuse astrocytoma following TP53 mutation eventually leading to secondary or type II GBM [1, 4, 5]. However, 30% of GBM show molecular alterations that correspond to neither the type I, nor the type II pathway [6-8], pointing to the limitations of this approach to molecular stratification. More so, this molecular stratification does not impact the choice of therapy or patient's outcome.

So far, the most useful prognostic tools in this disease remain clinical indices such as age, the Karnofsky (KPS) score and the histopathological grade, as was reported in the recursive partitioning analysis performed by the RTOG (radiotherapy oncology group) [9], as well as the KI-67 proliferative index. Recently, attempts to

categorize GBM according to the response to chemotherapy were proposed. Inactivity of the MGMT (*O*⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase) seems to increase the responsiveness of GBMs to alkylating agents. However, the MGMT promoter is methylated in only 45% of GBM [10, 11]. Various molecules have been proposed as potential biomarkers, but none has met with clinical acceptance yet [12].

The 3D organization of the genome and nucleus are essential components of tumorigenesis as stipulated by Theodore Boveri (1862-1915) a century ago [13, 14]. Telomeres, the nucleoprotein complexes located at the end of eukaryotic chromosomes, have essential roles in preserving chromosomal integrity. Intact telomeres prevent terminal fusions, degradation of the chromosome ends, and contribute to the adequate chromosome positioning within the nucleus [15]. The telomeres consist of a tandem repeated DNA sequence (TTAGGG in vertebrates) that varies in length from 5 to 15 kb in human. Telomere dysfunction is known to promote chromosomal instability (CIN) and carcinogenesis [16]. In most human somatic cells, telomeres act as a mitotic clock that limits indefinite cell division [17]. Telomeres are organized in a very typical way within the 3D space of the nucleus and telomeres of normal cells do not overlap [18]] and are localized in microterritories [19]. In contrary, telomeres of tumor cell nuclei show an altered 3D nuclear organization and form telomeric aggregates (TAs) that can be observed in the interphase nucleus [18]. Alterations in nuclear telomere architecture and telomeric dysfunction are associated with chromosomal instability (structural and numerical chromosomal instability, s/nCIN) [20, 21], which is a hallmark of glioblastoma [6, 22]. In the context of this study, we wondered whether the

telomeric nuclear architecture in GBM could serve as a marker of genetic instability and a biological marker-predicting patient outcome.

In the present paper, we thus introduce the 3D telomeric signatures of GBM nuclei and propose the use of these signatures as a novel all-encompassing biomarker suitable for characterizing and stratifying GBM and allowing us to increase accuracy to predict patient survival. In addition, the novel high-throughput automated 3D telomeric scanning approach we developed and applied in a blinded study to the GBM patients permits a quick scan and analysis of hundreds of nuclei for this and any related clinical or basic research application.

Materials and Methods

Patients

This study received approval by the research ethics board on human studies at the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS). Patients undergoing or having undergone surgery for GBM at the CHUS were enrolled in this study following the obtaining of written informed consent. The patient population included in this study was composed of 11 individuals, eight (72.7%) males and three (27.3%) females ranging in age from 25 to 66 years, with a median age of 46.5 years. These patients all depicted a pre-operative presumptive diagnosis of GBM that was confirmed at surgery. The fresh surgical biopsies obtained immediately after resection in the operating room were collected prospectively. All surgeries were performed on newly diagnosed, treatment-naive patients. Immediately after collection, touch preparation smear slides (TP slides) were prepared. The TP slides

were performed by smearing a core biopsy onto a glass slide, which was then air-dried [23]. The TP slides were fixed using fresh Carnoy (3 vol methanol/1 vol glacial acetic acid), air-dried overnight in a chemical hood, and stored at -20°C until they were used for QFISH (quantitative fluorescence in situ hybridization).

Histopathological analysis

Tumors were classified according to the World Health Organization (WHO) classification [1]. After surgical removal, tumor samples were fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin. Three micrometers sections were stained with hematoxylin and eosin and submitted to immunohistochemical reactions for the detection of GFAP, TP53, and EGFR expression. Additional sections were submitted for Ki-67 antibody staining to evaluate the proliferative index, which was defined as the ratio between the number of Ki-67 positive tumor cell nuclei and the total number of tumor cell nuclei counted; areas of high positivity were selected for the counts. Tumor vascularization was evaluated with the CD34 antibody. All antibodies were provided by DAKO (Carpinteria, USA). Tumors exhibiting variable GFAP positive cells within a fibrillar matrix, showing high cellularity, nuclear pleomorphism and neo-angiogenesis, and displaying necrotic areas together with a high mitotic count and/or Ki67 proliferative index were classified as GBM.

Fluorescent in situ hybridization (FISH) protocol for 3D analysis

The TP slides were thawed for 1 h at room temperature (RT). The procedure was performed as described previously [20]. Briefly, slides were incubated in 3.7% formaldehyde / phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) for 20 min and washed 3x

in 1x PBS for 5 min each. Slides were incubated in 0.5% Triton X-100 for 3 min followed by an incubation in 20% glycerol for 1 h, and 3D-preserved by three repeated cycles of glycerol/liquid nitrogen treatment [24] and washed 2x in 1x PBS for 5 min each followed by a 5 min incubation in 0.1N HCl. Prior to fixation in 3.7% formamide / 2x SSC at pH 7.0 for 1 h, slides were washed twice for 5 min in PBS. Immediately after fixation, 8 μ l of PNA telomeric probe (Dako; Glostrup, Denmark) was added to the slide. For denaturation of the nuclear DNA and the probe, the slides were incubated at 80 °C for 3 min followed by hybridization at 30 °C for 2 h using a Hybrite™ (Vysis; Abbott Diagnostics, Des Plaines, IL). The slides were washed twice for 15 min in 70% formamide / 10 mM Tris pH 7.4 followed by washing in 1x PBS at RT for 1 min while shaking and in 0.1x SSC at 55 °C for 5 min while shaking. Slides were washed in 2xSSC/0.05% Tween 20 twice for 5 min each at RT while shaking for 5 min, after which they were counterstained with DAPI (0.1 μ l/ml). Excess DAPI was removed with deionized distilled water prior to dehydration in ethanol at 70%, 90%, and 100% for 2 min each. The slides were then air-dried and cover slipped with Vestashield (Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada) for analysis.

Image acquisition and 3D image analysis using TeloView™ system

Imaging data from all patient GBM tissues were obtained by two independent image acquisition methods. As a gold standard, we performed 3D image analysis on 30 interphase nuclei per slide using an AxioImager Z1 microscope (Carl Zeiss Canada Ltd/) and an AxioCam HRm charge-coupled device (Carl Zeiss Canada Ltd.) [20]. A 100-x oil objective lens (Carl Zeiss Canada Ltd.) was used at acquisition times of

366 milliseconds (ms) for Cy3 (telomeres) and 109 ms for DAPI (nuclei). Sixty z-stacks were acquired at a sampling distance of *xy*: 107 nm and *z*: 200 nm for each slice of the stack. Axiovision 4.6 software (Carl Zeiss Canada Ltd.) and a constrained iterative algorithm [25] were used for deconvolution. Deconvolved images were converted into TIFF files and exported for 3D-analysis using the TeloView software program [20].

Image acquisition and 3D image analysis using the novel SpotScan system

The slides subjected to TeloView analysis were also scanned and analyzed using a novel SpotScan system (Applied Spectral Imaging, Migdal HaEmek, Israel) and the newly developed 3D TeloScan software. The system uses a fully automated Olympus BX61 microscope (Olympus, Center Valley, PA, USA) equipped with filters for DAPI and TRITC; the software included CaseDataManager 6.0 and ScanView. Imaging was done with an x60-magnification oil objective. Cells were detected based on DAPI nuclear stain. For each cell, images of 10 focal planes 0.7 microns apart were collected. SpotScan analyzed the 3D data based on DAPI (nucleus), and TRITC (telomeres). The data collected from each scan included information on number of signals, signal intensity, and the existence of aggregates within each nucleus examined. Three hundred nuclei per 20 minutes per scanned slide were classified according to their number of telomeres and recorded. Data were saved in Excel format. This tool combined with 3-QFISH technique and the data analyses will categorize a GBM patient in 9 to 12 hours after getting the sample.

Data presentation and statistical analysis

Three types of histogram were produced: i) line graphs showing the distribution in the intensity of the registered telomeric fluorescent signals; ii) histograms of the distribution of the number of aggregates per cell; and iii) histograms of the distribution of the number of registered signals per cell. The percentage of cells having telomeric aggregates, the mean number of signals, and mean number of aggregates per cell were calculated. The histogram data from different samples were combined into a single chart for comparison.

Overall survival and time to progression

Kaplan-Meier curves were estimated for survival and time to progression (TTP). Survival curves were compared with the log-rank tests. Distribution of telomere intensities was compared by chi-square analysis, while summary cell parameters were analyzed with nested factorial analysis of variance. Significance level was set at $\alpha = 0.05$.

Table 1: Clinical data of the population cohort studied.

| Patients | Age | Sex | First symptoms | Treatment | Time to progression | Median survival | Proliferativ -index in % | KPS Index |
|----------|-----|-----|--|--|---------------------|-----------------|-----------------------------|-----------|
| P1 | 25 | M | Headache, N+Vo+Seizure | Craniotomy, STUPP, Temodal | 26 days | 163 days | 15 | 70 |
| P2 | 26 | M | Seizure | Craniotomy, STUPP | 301 days | Still alive | 10 | 90 |
| P3 | 51 | M | Seizure | Craniotomy, STUPP, Temodal, | 306 days | 551 days | 50 | 90 |
| P4 | 55 | M | Headache Seizure | Craniotomy, STUPP, Temodal, intraarterial chemotherapy, CCNU | 149 days | 308 days | Nd | 40 |
| P5 | 58 | M | Left hemiparesis, Seizure | Craniotomy, STUPP, Temodal, intraarterial chemotherapy | 91 days | 490 days | 20 | 80 |
| P6 | 56 | M | Dysphasia Headache | Craniotomy, STUPP, Temodal | 595 days | Still alive | 30 | 80 |
| P7 | 24 | F | Headache, right hemiparesis | Craniotomy, intraarterial chemotherapy, Temodal | 587 days | 751 days | 30 | 80 |
| P8 | 46 | M | Dizziness, Headache, N+Vo | Craniotomy, STUPP, CCNU | 100 days | 880 days | 15 | 70 |
| P9 | 56 | M | Headache Left hemiparesis | Craniotomy, STUPP, Temodal, intraarterial chemotherapy, CCNU | 227 days | Still alive | 12 | 50 |
| P10 | 66 | F | Dysphasia, seizures | Craniotomy, STUPP, Temodal, intraarterial chemotherapy | 190 days | 430 days | 20 | 90 |
| P11 | 49 | F | Memory disturbances Headache Syncope | Craniotomy, STUPP, Temodal | 409 days | Still alive | 30 | 50 |

KPS: Karnofsky 's index or scale; N+Vo (nausea and vomiting); STUPP (Temozolomide+ radiotherapy)CCNU (lomustine); CT (computerized tomography); MRI (magnetic resonance imaging)

Number of telomeres, nuclear distribution of telomeres and telomeres aggregates.

We first analyzed the total number of telomeres in each sample with two methods (TeloView and TeloScan) and thereafter observed three categories of patients (Figures 1; 2; 3). Figure 1 illustrates telomeric nuclear signals of each patient category in two-dimensional (2D) and 3D images as determined using imaging and 3D reconstruction following constrained iterative deconvolution (Materials and Methods) [20, 25]. Figure 2 sums up the data of 30 nuclei per category as identified in our blinded study after the use of the quantitative 3D telomere analysis program TeloView [26]. Figure 3 shows screen shots of image galleries and patient histograms that were obtained after 3D automated scanning of nuclear telomeric signals (see Materials and Methods).

Patients fell into three categories that can be summarized by differences in telomere signal intensities and numbers as revealed by TeloView analysis (Figure 2) and TeloScan (Figure 3). TeloView indicated the presence of three different telomeric profiles that are shown in Figures 2a, b and c respectively. These profiles became apparent after the quantitative analysis of 30 nuclei of touch preparations prepared at surgery from treatment-naïve patients. In addition, these profiles indicate some diversity in cells within the tumor cell nuclei. For example, Figures 2a and b indicate that there are three sub-populations: nuclei with low relative fluorescent intensities representing cells with short telomeres, nuclei with intermediate relative fluorescent intensity indicating intermediate length of telomeres, and nuclei with telomeric signals of high intensity, *i.e.* large telomeres. Figure 2c illustrates that this

latter patient group lacks cells with very short telomeres, *i.e.* signals with low fluorescent intensity.

In general, interphase nuclei display less telomeres than expected due to their organization in microterritories and/or aggregates [19, 27]. Telomere numbers in our patients vary as obvious when profiles of Figures 2 a, b and c are compared (see arrows). Figure 2a indicates that patients within this category have a maximum number of 40 detected telomeric signals, Figure 2b indicates that that group has less telomeric signals (maximum is 20/cell), while Figure 2c shows that this patient group has increased numbers of telomeres (>50 per cell) when compared to the other two groups.

Automated 3D scanning using TeloScan (Figure 3) performed on the identical samples examined scanned and classified 300 cells per patient and also identified three patient categories. The first category (Figure 3a) shows telomere numbers ranging from 5-50, with the majority of telomeres being in the small to intermediate telomere number groups. The second category of scanned profiles (Figure 3b) has telomere numbers that vary from 5-100, with the majority of cells being in the mid-size range. The third category of scanned profiles (Figure 3c) also displays 5-100 telomeres per nucleus; however, the majority of the signals are in the high number range (50-100 telomeres).

In conclusion, both assays led to the identical categorization of patients, although TeloScan (Figure 3) examined a higher numbers of cells than TeloView.

After the analysis, the samples were decoded. The first category of patients was composed of two patients (P6 and P7), the second category was composed of 6 patients (P2, P3, P4, P9, P10 and P11), while the third was composed of 3 patients (P1, P5 and P8) (Table 1). These categories displayed significant differences along three parameters: telomere numbers/nucleus ($p = 0.0275$ with TeloView data and $p = <0.0001$ with TeloScan data), telomere length ($p = 0.0275$ with TeloView and TeloScan data), and number of telomeric aggregates ($p = 0.0464$ with TeloView data and $p = <0.0001$ with TeloScan data).

With respect to telomeric aggregates, category I displayed the lowest level, while category II was intermediate, and category III presented the highest telomeric aggregates level. We did not find significant differences when analyzing the average telomeric intensities ($p = 0.3132$) and the total telomeric intensities ($p = 0.3147$) between the three categories of patients.

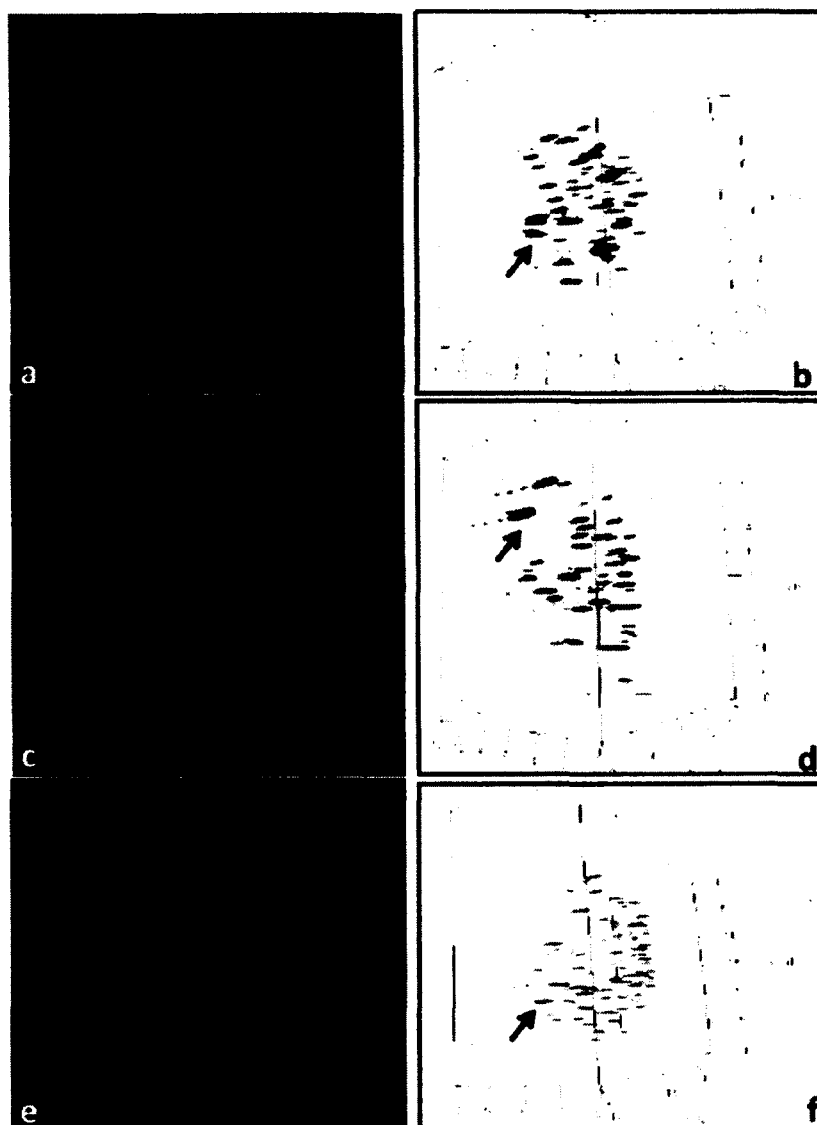


Figure 1: Two-dimensional (a; c; e) and three-dimensional images (b; d; f) of human GBM nuclei (blue) and their telomeres (red) imaged and visualized with AxioVision 4.6. Nuclear telomere distribution patterns define telomeric aggregates indicated with an arrow in the three categories of patient: (a; b) from P7 in category I; (c; d) from P9 in category II; and (e; f) from P1 in category III. The arrows point to the telomere aggregates.

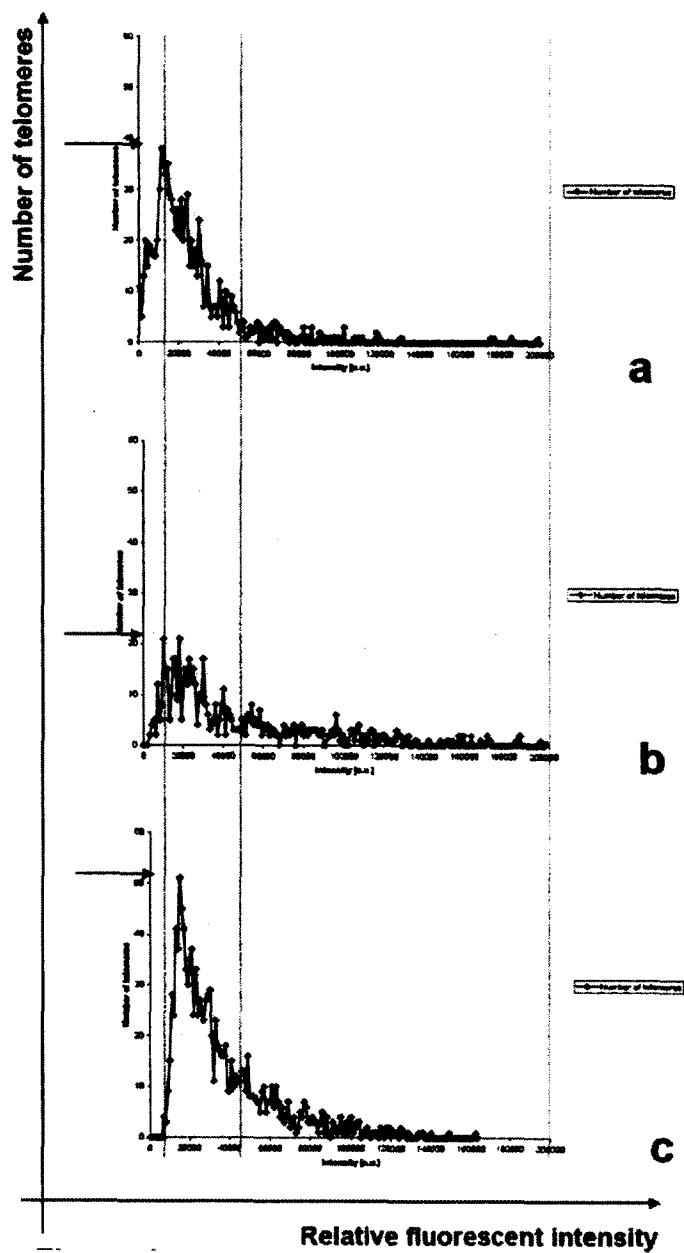


Figure 2: Number of telomeres vs. relative intensities of fluorescent signal analyzed by TeloViewTM. Lines and arrows define the three categories of cells. (a) Category I, P7; (b) category II, P9; (c) category III, P1. ($p = 0.0275$)

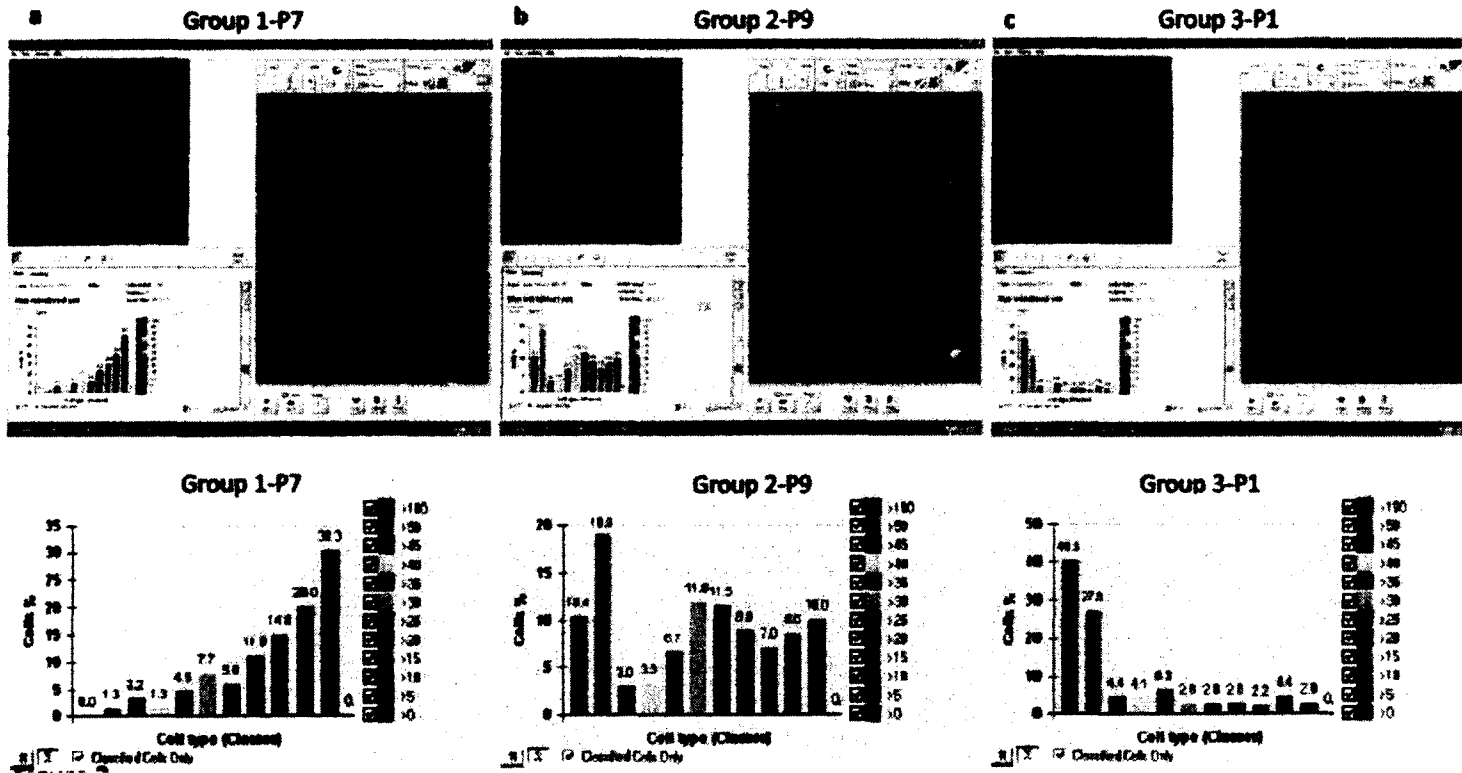


Figure 3: Screenshots of human GBM nuclei (blue) and telomeres (red) with ScanView 6.0TM. Displayed here: Upper panel: Screenshot of a selected field of the gallery of 20 scanned cells. Bottom panel: The corresponding histogram showing the distribution of classified defined cells based on the number of telomeres/cell. (a) Category I, P7; (b) category II, P9; and (c) category III, P1. For patient details, see Table 1.

Telomeres versus time to progression (TTP) and median survival (MS).

The MS for the 11 patients was 551 days (calculated from day of diagnosis to day of death or censoring), and the mean survival was 515 days (SE = +/- 75). As shown in Figure 4, patients in category I (curves CI) are characterized by longest TTP (591 days) and longest MS on Kaplan-Meier estimates (one censored; one died at 751 days). In contrast, patients in category II (curves CII) have an intermediate TTP (264 days) and an intermediate MS (three censored; three died at 308, 430 and 551 days respectively) (Figure 4). The patients in the third category (curves CIII) presented with the shortest TTP (92 days) and the shortest MS (1 censored; 2 died at 149 and 163 days respectively) (Figure 4). The Kaplan-Meier survival curves display significant difference between the three categories defined by the telomere analyses (Figure 4) ($p = 0.0393$). The TTP analyses also show significant differences between the three categories of patients ($p = 0.0167$). Interestingly, survival did not correlate with proliferation index ($p = 0.90$), or with Karnofsky (KPS) scale ($p = 0.86$) (Table 1) in this study. To our knowledge, this is the first molecular marker that enables such a distinction in GBM patients. Using this methodology allowed the production of Kaplan-Meier survival curves that reflected the telomere-based categorization of these patients. The 3D telomeric signature-based survival curves display significant differences between the three categories defined by the telomere analyses.

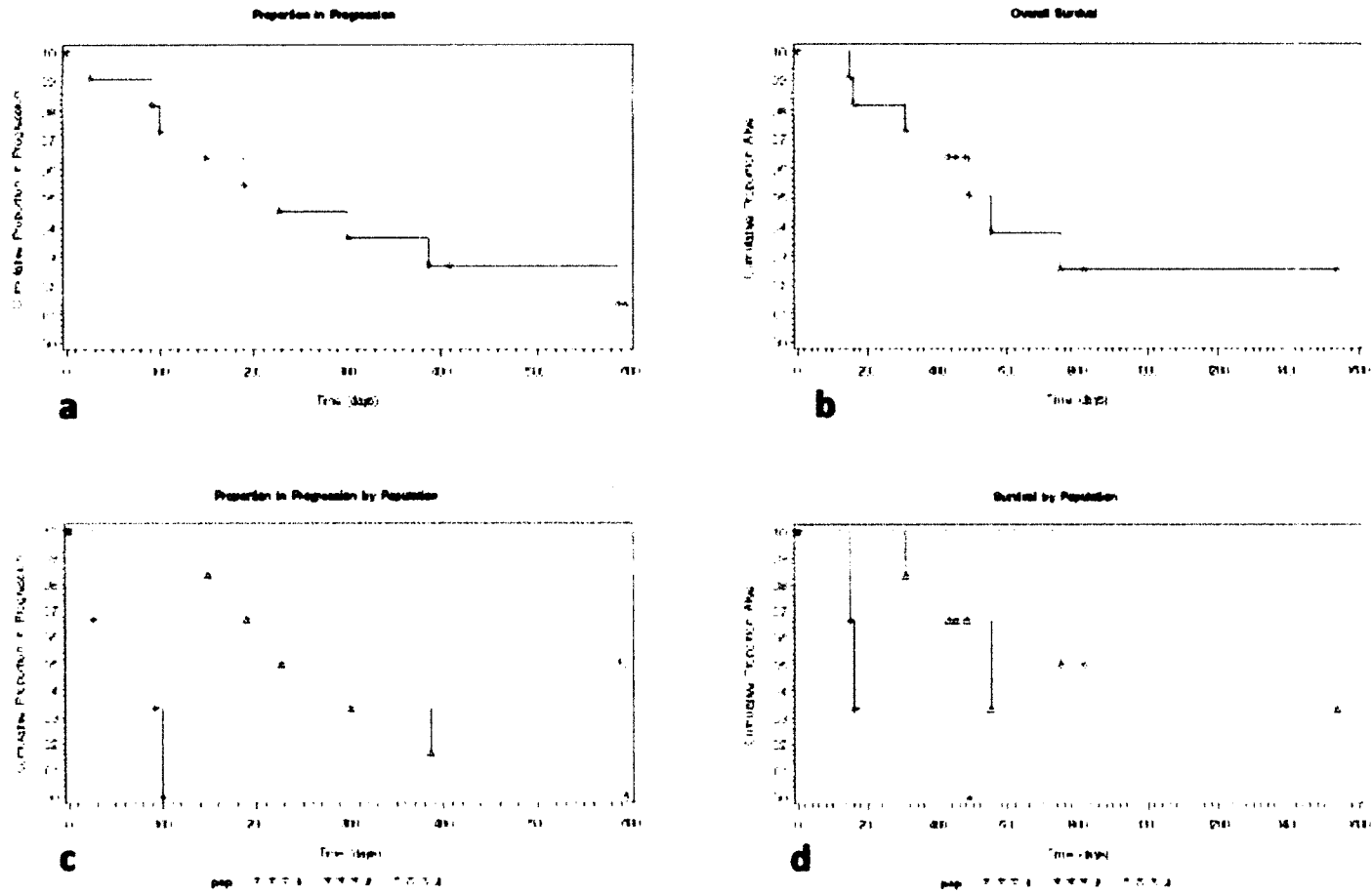


Figure 4: Kaplan-Meier curves depicting the TTP and overall survival of the three categories of population defined by telomere organization.

Telomeres and cell cycle distribution.

We studied the genomic stability of the cells in each patient by determining the a/c ratio and the nuclear volume. The nuclear space occupied by telomeres is measured by two main axes, a and b , that are equal in length, and a third axis, c , that has a different length [26]. The distribution of telomeres in the 3D space of the nucleus varies with cell cycle; as the specific stages of the cell cycle (G0/G1, S and G2) phases have characteristic a/c ratios, the investigator can determine where they reside in the cell cycle [26]. The a/c ratio is a mean of defining progression through cell cycle in interphase cells. Thus using this tool, we determined whether there was a difference in cell cycle between our patient groups. We did not find significant differences for the a/c ratio ($p = 0.82$) and for nuclear volume ($p = 0.9244$) between the 3 categories. The non-significant differences in a/c ratios are consistent with the high levels of proliferation in GBM and are consistent with the Ki-67 staining (Table 1). Moreover, we found several nuclear bridges indicative of breakage-bridge-fusion cycles in many of these samples (Figure 5) consistent with a high degree of genomic instability and telomere dysfunction.

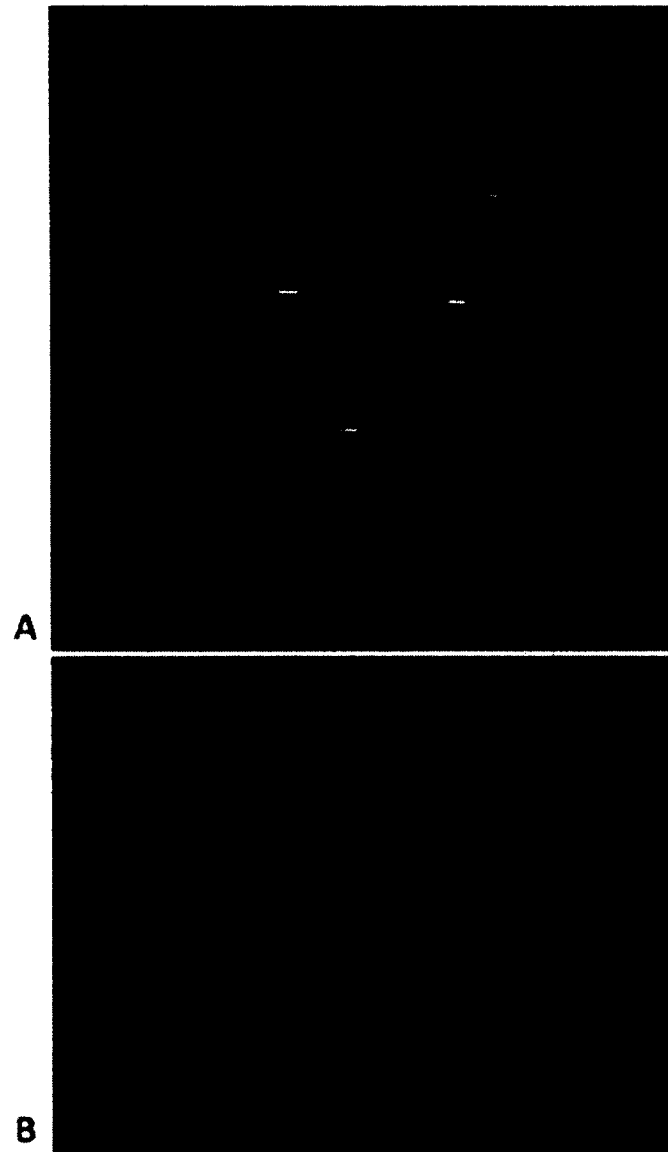


Figure 5: a) Human GBM nuclei presenting breakage-bridge-fusion (BBF), with their telomere distribution. Arrows point to nuclear bridges indicative of breakage-bridge-fusion cycles. b) Human GBM nuclei presenting nuclear fusion. These data are observed in all three patient categories. A qualitative evaluation showed that these characteristic figures of GBM are most prominent in category III, followed by category II and category I.

Discussion

Glioblastoma is a devastating disease, with only minor treatment breakthroughs in the last decades. We possess only a limited understanding of the disease process, as exemplified by the fact that patients diagnosed with common histopathological criteria display an extremely heterogeneous clinical evolution and response to treatment. Molecular characterization has failed so far in providing a stratification rationale. The only distinctive factors with some prognostic value so far have been the age at diagnosis and the KPS at presentation. Proliferative indices have been used with limited success to provide a pathological tool to refine biological stratification; however, a reliable biological and prognostic marker for GBM patients is clearly lacking.

Our previous data showed altered 3D telomeric organization in plasmacytoma [20, 28], cervical cancer [27, 29], Burkitt's lymphoma [18], and head and neck cancer [18]. More recently, we were able to gain a mechanistic understanding of the transition of mononuclear Hodgkin cells to multinuclear Reed-Sternberg cells [30]. Encouraged by these data, we investigated whether 3D nuclear telomeric architecture could predict disease aggressiveness in GBM and thus provide a new basis for defining clinically relevant prognostic patient categories. To this end and in a blinded fashion, 3D-FISH analyses of telomeres were carried out on touch preparations of fresh GBM samples (Table 1). We examined 3D nuclear telomeric parameters that included the total number of telomeres, their nuclear distribution, and the presence of telomeric aggregates (Figure 1).

Telomere numbers and their nuclear distribution differed markedly among patients within our GBM cohort (Figures 2 and 3). Two 3D quantitative telomere analysis tools allowed for this conclusion. We first used TeloView™, a 3D program we developed [26] that enables the manual capture of single nuclei and their 3D telomere parameters in an interactive manner. TeloView analysis of the sample slides was followed by use of a novel tool we developed, 3D TeloScan. This imaging program allows for automated and high-throughput 3D telomere scanning and analysis and automatically examines telomere numbers, intensities, and aggregates. Both methods led to the same basic conclusions. Based on defined telomere parameters, we identified three patient categories (I-III) within our GBM patient cohort (Table 1; Figures 2; 3).

Decoding of the samples allowed us to compare the clinical data with the 3D telomere-signature-based patient categories. The three categories corresponded to patients with long-term, intermediate, and short-term survival respectively ($p = 0.0393$) (Table 1, Figure 4). The time to progression (TTP) analyses showed significant differences between the three categories of patients as well ($p = 0.0167$) (Table 1, Figure 4). There was thus an expected correlation between time to progression and median survival. In this study, the natural history of GBM evolution was therefore predicted by nuclear telomere architecture distinguishing long-term survival GBM (category I) from short-term survival GBM (category III). This prognostic value of the 3D-nuclear telomere architecture analysis will need to be validated with a larger set of patients. However if this observation is confirmed, this methodology could eventually provide valuable guidance in clinical treatment

decisions by identifying and monitoring patient responses to existing and newly emerging therapies. The 3D nuclear telomere architecture characterization in GBM could be used as an individual GBM patient biomedical profile index in tailored-therapy approaches acting as an important novel predictive biomarker. This is the case in *PML-RARA* translocation in promyelocytic leukemia (PML), which responds to all-*trans* retinoic acid, and *BCR-ABL* translocation in chronic myelocytic leukemia (CML), which responds to imatinib mesylate [31]. Finally, we suggest that 3D-nuclear telomere architecture could measure the near-term treatment effects of a drug on the GBM tumor cells directly as a pharmacodynamic biomarker. This could be performed by an initial 3D-FISH on a touch preparation slide of the tumor upon surgery to categorize the GBM patient. 3D-FISH could then be repeated during a follow-up on touch preparation slide derived from stereotactic biopsies after a given treatment. This stepwise analysis could allow re-categorizing a patient and monitoring the evolution of his tumor. The remodeling of the nuclear telomere architecture and the consequent change of category of the GBM patient could then aid to adjust therapeutic options. Since the telomere aggregates represent a clear distinction between normal and tumor cells, we hypothesize that a decreased number of telomeric aggregates in the tumor would reflect tumor response to treatment. The newly established high-throughput semi-automatic nuclear scanning method (TeloScan) allows categorizing GBM patients in 9 to 12 hours after surgery or stereotaxic biopsy. Therefore, the telomere biomarker can be used with different clinical surrogates and could eventually be incorporated in clinical trials as a monitoring tool providing a new basis for more effective therapies aimed at improving the dire prognosis of GBM.

Clinical management of patients bearing GBM is greatly influenced by the Karnofsky Performance Status (KPS). In our study, the 3D telomeric stratification signature was infinitely more reliable than the KPS, the most useful current clinical prognostic factor, in predicting median survival (MS) and time to progression (TTP). Cohort MS in this series failed to correlate with either KPS ($p = 0.86$) or proliferation index ($p = 0.90$), which is clear evidence of the usefulness of our methods of analysis. Some studies have pointed to the value of the proliferative index as a prognostic tool [32, 33], but this remains highly controversial [34].

The proliferation index measured by Ki-67 staining was confirmed by the *a/c* ratio as measured with TeloViewTM [26]. The *a/c* ratio defines cell-cycle progression in interphase cells and is based on the dynamic organization of the telomeres in the 3D space of the interphase nucleus during the cell cycle [26]. We did not find significant differences between the three patient categories for the *a/c* ratio ($p = 0.82$) or the nuclear volume ($p = 0.92$). Specific features of 3D telomeric signatures, such as telomere numbers/nucleus, telomere length, and number of telomeric aggregates, are, as mentioned above, causal factors in genomic instability in cancer cells. Importantly, many of the patient samples from all three categories displayed multiple nuclear bridges indicative of breakage-bridge-fusion cycles, which is consistent with a high degree of genomic instability in GBM (Figure 5). Highest incidence of multiple nuclear fusions and breakage-bridge-fusions was evident in GBM of category III, thus supporting the notion that this new methodology is

predictive of genomic instability, and that this genomic instability directly correlates with survival.

Conclusion

Malignant GBMs have a dire prognosis. We describe for the first time the 3D nuclear telomeric architecture as a suitable biomarker for predicting the prognosis of GBMs and linking progression to patient survival. Telomeric architecture appears to be a more accurate parameter for monitoring GBMs than any of those in current common use for their clinical stratification. The identification of 3D-telomeric signatures for clinical categorization, combined with our new high-throughput method for monitoring these signatures, opens the door to future routine use of this marker as a tool for the clinical management of gliomas. This marker needs to be validated with a more extensive set of GBM patients, as well as with WHO Grade II and Grade III astrocytomas, to allow for a differential comparison across the whole spectrum of astrocytic malignancy. Our findings provide a new analysis tool, with results from 9 to 12 hours after surgery, and add important information to the molecular mechanisms on the evolution and progression of GBMs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr. David Eisenstat for critical review of the data, to Ms. Marie Boudrias and Dr. Jana Harizanova for their excellent technical help, and to Ms. Mary Cheang for statistical analyses and Mrs. Rina Kampeas for the excellent editing work. We also thank the patients who made this study possible. MG was supported by a short-term fellowship under the CIHR Strategic Training Program

“Innovative Technologies in Multidisciplinary Health Research Training” (SM). The study was partly supported by the CancerCare Manitoba Foundation to SM. DF holds the National Bank of Canada Chair for the Treatment of Brain Cancer. TK is grateful for financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Manitoba Health Research Council (MHRC). RD holds a Canada Research Chair in Genetics, Mutagenesis, and Cancer. SM is the Director of the Genomic Centre for Cancer Research and Diagnosis.

REFERENCES

- [1] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW and Kleihues P (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **114**, 97-109.
- [2] Louis DN, Pomeroy SL and Cairncross JG (2002). Focus on central nervous system neoplasia. *Cancer Cell* **1**, 125-128.
- [3] Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M and Schackert G (2007). Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* **130**, 2596-2606.
- [4] Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA and Cavenee WK (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* **21**, 2683-2710.
- [5] Wen PY and Kesari S (2008). Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* **359**, 492-507.

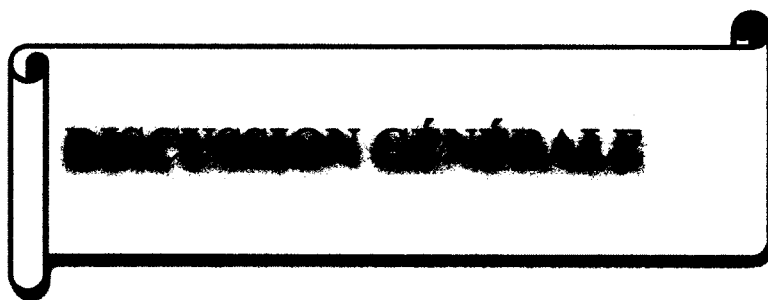
- [6] Martinez R, Schackert HK, Plaschke J, Baretton G, Appelt H and Schackert G (2004). Molecular mechanisms associated with chromosomal and microsatellite instability in sporadic glioblastoma multiforme. *Oncology* **66**, 395-403.
- [7] Kleihues P and Ohgaki H (1999). Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol* **1**, 44-51.
- [8] Holland EC (2001). Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet* **2**, 120-129.
- [9] Scott CB, Scarantino C, Urtasun R, Movsas B, Jones CU, Simpson JR, Fischbach AJ and Curran WJ, Jr. (1998). Validation and predictive power of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) recursive partitioning analysis classes for malignant glioma patients: a report using RTOG 90-06. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **40**, 51-55.
- [10] Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC and Stupp R (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **352**, 997-1003.
- [11] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG and Mirimanoff RO (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in

glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* **10**, 459-466.

- [12] Riemenschneider MJ and Reifenberger G (2009). Novel insights into the pathogenesis of gliomas based on large-scale molecular profiling approaches. *Curr Opin Neurol*.
- [13] Boveri T (1902). über mehrpolige mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. *Verh Phys Med Gesellschaft Worzburg* **35**, 67-90.
- [14] Boveri T (1914). Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. *Fischer, Jena*.
- [15] Callen E and Surrallés J (2004). Telomere dysfunction in genome instability syndromes. *Mutat Res* **567**, 85-104.
- [16] DePinho RA and Polyak K (2004). Cancer chromosomes in crisis. *Nat Genet* **36**, 932-934.
- [17] Lansdorp PM (2009). Telomeres and disease. *EMBO J* **28**, 2532-2540.
- [18] Chuang TC, Moshir S, Garini Y, Chuang AY, Young IT, Vermolen B, van den Doel R, Mougey V, Perrin M, Braun M, Kerr PD, Fest T, Boukamp P and Mai S (2004). The three-dimensional organization of telomeres in the nucleus of mammalian cells. *BMC Biol* **2**, 12.
- [19] De Vos WH, Hoebe RA, Joss GH, Haffmans W, Baatout S, Van Oostveldt P and Manders EM (2009). Controlled light exposure microscopy reveals dynamic telomere microterritories throughout the cell cycle. *Cytometry A* **75**, 428-439.
- [20] Louis SF, Vermolen BJ, Garini Y, Young IT, Guffei A, Lichtensztein Z, Kuttler F, Chuang TC, Moshir S, Mougey V, Chuang AY, Kerr PD, Fest T,

- Boukamp P and Mai S (2005). c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9613-9618.
- [21] Mai S and Garini Y (2005). Oncogenic remodeling of the three-dimensional organization of the interphase nucleus: c-Myc induces telomeric aggregates whose formation precedes chromosomal rearrangements. *Cell Cycle* **4**, 1327-1331.
- [22] Saito T, Hama S, Izumi H, Yamasaki F, Kajiwara Y, Matsuura S, Morishima K, Hidaka T, Shrestha P, Sugiyama K and Kurisu K (2008). Centrosome amplification induced by survivin suppression enhances both chromosome instability and radiosensitivity in glioma cells. *Br J Cancer* **98**, 345-355.
- [23] Gadji M, Fortin D, Tsanaclis AM and Drouin R (2009). Is the 1p/19q deletion a diagnostic marker of oligodendrogliomas? *Cancer Genet Cytogenet* **194**, 12-22.
- [24] Solovei I, Walter J, Cremer M, Habermann F, L. S and Cremer T, *FISH on three-dimensionally preserved nuclei*, in *FISH A Practical Approach*, B Beatty, S Mai and J Squire, Editors. 2002, Oxford University Press: New York. p. 119-157.
- [25] Schaefer I.H, Schuster D and Herz H (2001). Generalized approach for accelerated maximum likelihood based image restoration applied to three-dimensional fluorescence microscopy. *J Microsc* **204**, 99-107.
- [26] Vermolen BJ, Garini Y, Mai S, Mougey V, Fest T, Chuang TC, Chuang AY, Wark L and Young IT (2005). Characterizing the three-dimensional organization of telomeres. *Cytometry A* **67**, 144-150.

- [27] Mai S and Garini Y (2006). The significance of telomeric aggregates in the interphase nuclei of tumor cells. *J Cell Biochem* **97**, 904-915.
- [28] Guffei A, Lichtensztejn Z, Goncalves Dos Santos Silva A, Louis SF, Caporali A and Mai S (2007). c-Myc-dependent formation of Robertsonian translocation chromosomes in mouse cells. *Neoplasia* **9**, 578-588.
- [29] Guijon FB, Greulich-Bode K, Paraskevas M, Baker P and Mai S (2007). Premalignant cervical lesions are characterized by dihydrofolate reductase gene amplification and c-Myc overexpression: possible biomarkers. *J Low Genit Tract Dis* **11**, 265-272.
- [30] Knecht H, Sawan B, Lichtensztejn D, Lemieux B, Wellinger RJ and Mai S (2009). The 3D nuclear organization of telomeres marks the transition from Hodgkin to Reed-Sternberg cells. *Leukemia* **23**, 565-573.
- [31] Sawyers CL (2008). The cancer biomarker problem. *Nature* **452**, 548-552.
- [32] Faria MH, Goncalves BP, do Patrocinio RM, de Moraes-Filho MO and Rabenhorst SH (2006). Expression of Ki-67, topoisomerase IIalpha and c-MYC in astrocytic tumors: correlation with the histopathological grade and proliferative status. *Neuropathology* **26**, 519-527.
- [33] Vaquero J, Zurita M, Coca S and Oya S (2002). Imbalance between p53 expression and proliferative index can predict survival in primary glioblastoma. *Acta Neurochir (Wien)* **144**, 151-155; discussion 155-156.
- [34] Lafuente JV, Alkiza K, Garibi JM, Alvarez A, Bilbao J, Figols J and Cruz-Sanchez FF (2000). Biologic parameters that correlate with the prognosis of human gliomas. *Neuropathology* **20**, 176-183.



DISCUSSION GÉNÉRALE

3. Discussion générale

L'investigation et la recherche sur les cancers ont bénéficié des nombreuses avancées technologiques. Plusieurs approches allant de la cytogénétique à la cytogénomique et même au protéomique peuvent être utilisées pour étudier les cancers. En fait la démarche est tributaire de l'échantillon de tumeurs à savoir si on peut obtenir de l'ADN, de l'ARN ou des protéines. Si on prend comme exemple la découverte de la translocation *TMPRSS2/ETS* dans le cancer de la prostate, il y a eu l'utilisation d'une banque de données (Oncomine), puis une approche génomique avec confirmation par la cytogénétique moléculaire. Un autre exemple est l'utilisation de l'épissage alternatif de l'ARN dans une approche protéomique pour distinguer les tissus cancéreux des tissus normaux dans le cancer des ovaires et le cancer du sein (KLINCK *et al.*, 2008; VENABLES *et al.*, 2008). Nous avons étudié les tumeurs cérébrales primaires traitées et suivies au CHUS en utilisant une approche classique c'est à dire en partant de la cytogénétique conventionnelle jusqu'à la génomique. Pour ce faire nous avons choisi de travailler avec l'ADN et son unité de compactage, le chromosome, qui sont les supports de l'information génétique. Quelque soit la démarche utilisée, la finalité demeure la même à savoir de mieux comprendre les bases génétiques du cancer avec l'objectif de découvrir des marqueurs biologiques (biomarqueurs) qui peuvent permettre le diagnostic précoce, le suivi, la prise en charge médicale des cancers et de dégager de nouvelles pistes thérapeutiques plus efficaces contre ces tumeurs (CARROLL, 2007; SAWYERS, 2008). Nos résultats de recherche nous ont conduit à nous poser trois questions à savoir :

- si la délétion combinée 1p/19q pourrait aussi être un marqueur diagnostique des oligodendrogliomes,
- quel est le mécanisme à la base de ces translocations
- et aussi si l'organisation nucléaire télomérique pourrait être un biomarqueur des GBM?

3.1. Les délétions 1p/19q dans les oligodendrogliomes

La délétion combinée 1p/19q dans les oligodendrogliomes est reconnue comme biomarqueur pronostique de ces tumeurs. Elle est aussi reconnue comme marqueur prédictif malgré encore quelques réticences (BOULAY et MERLO, 2009; BOUVIER *et al.*, 2004). Nous avons utilisé les deux méthodes les plus fréquemment employées pour rechercher les délétions 1p et 19q (chapitre 1 article 1) à savoir la technique FISH et la LOH. Nous avons ainsi apporté une approche originale en utilisant la technique des empreintes sur lames pour faire la FISH. Nous avons remarqué que la délétion 1p/19q est toujours présente dans les oligodendrogliomes purs et presque toujours dans la composante oligodendrogliale des tumeurs mixtes oligoastrocytaires mais également dans les glioblastomes avec une composante oligodendrogliale (El-JAWAHRI *et al.*, 2008; FRANCO-HERNANDEZ *et al.*, 2009; NAGASAKA *et al.*, 2007). À partir de nos résultats et à la lumière de la littérature médicale sur ce sujet, nous remarquons qu'un oligodendrogliome pur présente toujours la délétion combinée 1p/19q. Nous avons pu montrer que cette délétion combinée qui est un biomarqueur pronostique et prédictif, représente aussi un biomarqueur diagnostique des oligodendrogliomes

(chapitre 1 article 1). Le fait que cette délétion 1p/19q n'est pas spécifique des oligodendrogliomes ne réduit en rien sa valeur diagnostique car la translocation *BCR-ABL1* qui est le marqueur diagnostique de la LMC est aussi présente dans les LAL. La valeur diagnostique de la délétion 1p/19q ne fait presque plus de doute dans les grands centres de prise en charge des oligodendrogliomes comme ici au CHUS. Cependant la preuve formelle de la valeur diagnostique de la délétion combinée 1p/19q viendra de la découverte d'un marqueur immunohistologique spécifique aux cellules oligodendrogiales qui pourra être combiné avec la FISH ou la LOH pour la recherche de cette délétion. On pourrait ainsi mettre en évidence que toute tumeur oligodendrogiale positive pour ce marqueur montrerait la présence de la délétion 1p/19q. Des marqueurs comme Olig1 et Olig2 ont déjà été présentés comme marqueurs des oligodendrogliomes mais ils ne sont pas spécifiques (MARIE *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2001). Ils sont aussi exprimés par les astrocytomes (BOUVIER *et al.*, 2003). Enfin la preuve formelle et irréfutable de la valeur diagnostique de la 1p/19q viendra de la découverte du ou des gènes suppresseurs de tumeurs qui logeraient au niveau du bras chromosomique 1p et/ou du bras chromosomique 19q. La perte de ces derniers serait à l'origine de la survenue des tumeurs oligodendrogiales. C'est pourquoi des recherches intenses ont été menées pour trouver de potentiels gènes suppresseurs de tumeurs localisés sur le 1p et/ou 19q. Ces recherches ont conduit à la détermination de régions minimales d'intérêt (voir chapitre 1, article 1) et aussi à de potentiels gènes suppresseurs de tumeurs. Parmi ces derniers on peut citer le gène:

- *TP73* (1p36.32) : ce gène encode pour la protéine p73 qui présente des homologies de séquences considérables avec la protéine p53 (KAGHAD

et al., 1997). Aucune mutation de ce gène n'a été rapportée dans les oligodendrogliomes à ce jour (ALONSO *et al.*, 2001 ; MAI *et al.*, 1998). Cependant des études ont décrit une hyperméthylation du promoteur du gène *TP73* dans une proportion d'oligodendrogliomes (DONG *et al.*, 2002 ; WATANABE *et al.*, 2002). Par contre des études ont trouvé une expression monoallélique normale de ce gène dans le rein et les poumons à l'opposé d'une expression biallélique au niveau des tumeurs affectant ces 2 types de tissus (MAI *et al.*, 1998b ; MAI *et al.*, 1998c). De plus ce gène subit une expression avec empreinte maternelle (KAGHAD *et al.*, 1997). La perte de cette empreinte conduit à une surexpression du gène inhibé pouvant jouer un rôle dans l'oncogenèse (KAGHAD *et al.*, 1997). En résumé, le gène *TP73* jouerait un rôle complexe dans l'oncogenèse avec deux isoformes TAp73 et Δ Np73 venant de promoteurs différents. TAp73 a une fonction de gène suppresseur de tumeur et Δ Np73 une fonction d'oncogène (MELINO *et al.*, 2002). En définitive le rôle de *TP73* dans l'oncogenèse et dans la genèse des oligodendrogliomes reste à déterminer.

- *CDKN2C* (p18^{INK4c}) Inhibiteur de la cycline dépendante des Kinases (Cyclin-dependent kinase inhibitor) ou *RAD54L* (1p32) : Des mutations de *CDKN2C* ont été rapportées dans très peu d'oligodendrogliomes (HUSEMANN *et al.*, 1999 ; HE *et al.*, 2000 ; MATSUDA *et al.*, 1999). Par contre des mutations du gène de *RAD54L* qui code pour une enzyme de réparation de l'ADN n'ont pas été détectées (BELLO *et al.*, 2000). En

définitive il est peu probable que ces deux gènes aient un rôle majeur dans la genèse des oligodendrogliomes.

- *CAMTA1* (1p36): Ce gène est exprimé normalement et préférentiellement dans les tissus cérébraux sains de l'adulte. Cependant le niveau d'expression de ce gène est très bas dans les oligodendrogliomes (BARBASHINA *et al.*, 2005). Cette expression est réduite de moitié dans les oligodendrogliomes présentant la délétion 1p comparativement à ceux sans cette délétion. Néanmoins malgré cette réduction d'expression on ne retrouve pas de mutations somatiques de ce gène dans les oligodendrogliomes (BARBASHINA *et al.*, 2005).
- - *GLTSCR1* et *GLTSCR2* (19q13.3): (glioma tumor suppressor candidate region gene 1 et 2).
- *EHD2* (19q13.3) qui avec *EHD3* et *EHD4* encode des protéines appartenant à une famille hautement conservée de protéines contenant un domaine EH.

On n'a pas retrouvé d'anomalies au niveau de ces gènes après séquençage (SMITH *et al.*, 2000; POHL *et al.*, 2000., YANG *et al.*, 2005).

Au demeurant la découverte des mécanismes qui génèrent la délétion combinée 1p/19q et la délétion 1p seule (chapitre 1) supporte le potentiel diagnostique de la délétion 1p/19q dans les oligodendrogliomes. Par exemple en utilisant notre technique d'empreinte tumorale (« touch préparation ») après une biopsie stéréotaxique ou après chirurgie, on peut facilement mettre en évidence la présence de cette translocation sur des noyaux interphasiques par la méthode FISH en utilisant des sondes appropriées. Ainsi la connaissance du mécanisme peut

permettre de développer des outils appropriés pour la mise en évidence de la délétion et/ou de la translocation. Ceci rappelle toutes les autres translocations ou délétions présentes dans les hémopathies malignes qui sont recherchées par FISH. Curieusement ce sont des translocations qui sont mises en cause dans la survenue de ces délétions dans les oligodendrogliomes.

3.2. Les translocations chromosomiques génératrices de la délétion

1p/19q

Trois années avant nous, deux études ont montré que les délétions 1p/19q viendraient de la translocation entre les chromosomes 1 et 19. Cette translocation serait liée aux homologies de séquences centromériques entre ces deux chromosomes (GRIFFIN *et al.*, 2006; JENKINS *et al.*, 2006). Nos recherches nous ont permis de découvrir une translocation entre les chromosomes 1 et 7 à l'origine de la délétion 1p seule dans un cas d'oligoastrocytome (chapitre 1, Article 2). Cette translocation a été retrouvée dans toutes les métaphases analysées de la tumeur. Ceci constitue un argument fort qu'elle est à l'origine de la transformation tumorale. En effet, si elle était un événement secondaire à l'évolution de la tumeur alors elle serait purement clonale c'est à dire présente dans seulement une partie des cellules tumorales. Par conséquent elle ne serait retrouvée que sur une partie des métaphases analysées (chapitre 1, Article 2). On pourrait associer aussi cette translocation à l'homologie de séquences entre les chromosomes 1 et 7. Cependant, le chromosome 1 possède une homologie de séquence avec d'autres chromosomes que les chromosomes 19 et 7. Pourquoi donc des translocations uniques entre ces trois

chromosomes sont retrouvées spécifiquement dans les oligodendrogliomes? Une explication plausible serait que l'organisation spatiale du génome est spécifique à un tissu et que ces trois chromosomes seraient dans le même territoire chromosomique ou dans des territoires contiguës dans le tissu glial. Il est clairement établi que l'organisation nucléaire du génome favoriserait la formation de translocations spécifiques à une tumeur donnée (GOLLIN, 2007). Comment donc l'organisation nucléaire des oligodendrocytes pourrait favoriser la survenue de ces dites translocations?

3.3. Organisation nucléaire et translocations chromosomiques dans les oligodendrogliomes

La fréquence élevée des translocations chromosomiques dans les cancers n'est plus à démontrer. En effet les deux banques de données en donnent une illustration très pertinente (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman> et <http://atlasgeneticsoncology.org>). Le débat continue sur les mécanismes qui sont à la base de ces translocations et de tous les autres réarrangements chromosomiques.

3.3.1 : Mécanismes de survenue des translocations chromosomiques dans le cancer

Les translocations chromosomiques dans le cancer impliquent que deux ou plusieurs chromosomes subissent simultanément des cassures et se lient ensemble l'un à l'autre. Cette translocation doit conférer un avantage prolifératif ou de survie à la cellule lui permettant de faire une expansion clonale (GOLLIN, 2007). En fait, les

translocations chromosomiques résulteraient de la cassure des deux brins de l'ADN (DSB) suivie d'une réparation aberrante de l'ADN. Deux modèles sont proposés pour expliquer les translocations entre deux chromosomes :

- le modèle de la première cassure qui stipule que des cassures surviennent sur des chromosomes partenaires qui sont distants et sont capables de se chercher dans l'espace nucléaire pour se retrouver et produire une translocation (ATEN *et al.*, 2004; SAVAGE, 2000).
- Le deuxième modèle est le premier contact qui propose que les translocations ne surviennent que si les cassures se font sur les fibres de chromatine qui colocalisent au moment du dommage à l'ADN (SAVAGE, 1993; SAVAGE, 2000).

Les évidences de l'implication de ces deux modèles dans la survenue de cancer ont été depuis longtemps trouvées en cytogénétique. Comme exemple on a les patients présentant un syndrome d'instabilité génétique comme l'anémie de Fanconi, le syndrome de Bloom et l'ataxie télangiectasie (AT) (GOLLIN, 2007). Ces patients présentent un risque élevé de développer des hémopathies malignes. Par exemple les patients avec l'anémie de Fanconi sont à risque de développer un syndrome myélodysplasique (MDS) et une leucémie myéloïde aigue (LAM) qui ressemblent à ceux secondaires à une chimiothérapie par les agents antialkylants (t-MDS, t-AML) (BAGBY et ALTER, 2006; GOLLIN, 2007; TISCHKOWITZ et DOKAL, 2004). Les patients qui souffrent du syndrome de Bloom développent les deux types de leucémies, soit myéloïde ou lymphoïde (RASSOOL, 2003). Enfin les patients avec

AT et des mutations sur les gènes ATM, développent des lymphomes primaires à cellules B et des leucémies à cellules T de type leucémie prolymphocytaire chronique à cellule T (TAYLOR *et al.*, 1996). Cependant, quelles seraient les voies moléculaires impliquées dans la survenue de ces translocations?

3.3.2. : Les voies moléculaires à la base de la génération des translocations chromosomiques

La conclusion qui émane de ces observations et des nombreuses études qui ont permis de comprendre les bases moléculaires de ces pathologies constitutionnelles, est que la réponse aux dommages à l'ADN incluant les voies de signalisation ATM et ATR est critique dans le développement et la réponse aux traitements des hémopathies malignes (GOLLIN, 2007). ATM et ATR, deux phosphatidyl inositol 3-kinases, sont au début de la réponse aux dommages à l'ADN en phosphorylant leurs substrats initiant ainsi des cascades de signalisation qui aboutissent à l'arrêt du cycle cellulaire, à l'apoptose et la réparation de l'ADN. Parmi la trentaine de substrats de ATM on note les protéines ABL1, p53, p95/NBS/nigrin, BRCA1 et CHK2. La protéine ATM est plus impliquée dans la réponse aux dommages induits par les radiations ionisantes. Par contre la protéine ATR est plus impliquée dans la réponse aux UV et aux agents qui bloquent la progression de la fourche de réplication comme l'hydroxyurée et l'aphidicoline. Ces deux voies, ATM et ATR, sont interconnectées. ATR est un facteur clé pour le maintien de l'intégrité chromosomique. Ces deux voies interviennent dans la réparation des dommages à l'ADN.

3.3.3. : Réparation des cassures bicaténares de l'ADN

Les causes de dommages à l'ADN dans le cancer sont les rayons ultra-violet (UV), les radiations ionisantes (RI), les inhibiteurs de la topoisomérase II, des mutagènes environnementaux, des erreurs cellulaires comme la réplication de l'ADN par les mésappariements, les erreurs durant la recombinaison V(D)J, le collapse de la fourche de réplication et enfin des dommages causés naturellement par les espèces d'oxygène réactifs. Dans une cellule, les réponses aux dommages à l'ADN impliquent de sentir le dommage suivi de la traduction du dommage en signal à un réseau de voies de signalisation cellulaire. Ce réseau comporte entre autres les voies de réponse de survie cellulaire, des points de contrôle du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN, de l'apoptose et des réponses de stress au maintien de télomères. En effet la perte du complexe shelterin par les télomères entraînent en plus de leur raccourcissement, leur reconnaissance comme une cassure bicaténaire de l'ADN (voir introduction) entraînant la mise en branle de la machinerie de réparation impliquant ATM et ATR. Cependant, les deux grands mécanismes les plus utilisés dans la réparation des cassures bicaténares de l'ADN dans les cellules de mammifères sont les réparations par recombinaison homologue (HRR) et par recombinaison non-homologue (NHEJ). La HRR intervient durant la phase S tardive et la phase G2 du cycle cellulaire, par contre le NHEJ, qui est une voie sujet à des erreurs, fonctionne à travers tout le cycle cellulaire. Dans le NHEJ, la jointure entre deux chromosomes non-homologues entraîne une translocation caractérisée par une délétion de plus de 100 bp et dans les régions de microhomologie de

séquences d'ADN par une délétion de plus de 7 bp de long (WEINSTOCK *et al.*, 2006a; WEINSTOCK *et al.*, 2006b). Dans les hémopathies malignes il y a des évidences que les points de cassures pour les jonctions entraînant une translocation dans plusieurs leucémies sont caractérisés par des régions de microhomologie de séquence d'ADN typique de la NHEJ. On peut citer comme exemple les translocations *BCR/ABL1* dans la LMC, *ETV6/RUNX1* dans la LAL et le *PML/RARA* dans la leucémie aigue promyélocytaire (LAM3) (RASSOOL, 2003; STRICK *et al.*, 2006).

3.3.4. : Organisation nucléaire et translocations chromosomiques

De plus, les cassures chromosomiques simultanées dans un noyau interphasique au niveau des séquences répétées comme les Alu, les centromères, les télomères et un état de la chromatine ouverte favorisent la survenue de translocation. Il est connu que la proximité spatiale des territoires chromosomiques dans le noyau favorise les translocations entre chromosomes mais également les réarrangements entre gènes (GOLLIN, 2007). Donc l'organisation nucléaire joue un rôle clé dans le mécanisme de survenue de ces translocations. Plusieurs auteurs ont rapporté des changements de position de territoires chromosomiques au cours de la différenciation cellulaire, au cours d'un état pathologique et durant un état de quiescence ou de sénescence (BRIDGER *et al.*, 2000). En effet, ces territoires chromosomiques seraient arrangés par la densité de gènes (BRIDGER *et al.*, 2000; CREMER *et al.*, 2001; CREMER *et al.*, 2003; CROFT *et al.*, 1999; MEABURN *et al.*, 2007) et la taille du chromosome (BOLZER *et al.*, 2005; BOYLE *et al.*, 2001; BRIDGER *et al.*, 2000; CREMER *et al.*, 2001; MEABURN *et al.*, 2007). Les chromosomes riches en gènes se situeraient

au centre nucléaire et ceux pauvres en gènes à la périphérie nucléaire sans tenir compte de leur état prolifératif (BOYLE *et al.*, 2001; BRIDGER *et al.*, 2000; CREMER *et al.*, 2001; CROFT *et al.*, 1999). En plus des corrélations très fortes existent entre la proximité spatiale des chromosomes et des gènes dans les noyaux interphasiques et la fréquence des translocations (MEABURN *et al.*, 2007). L'exemple classique de la translocation *BCR/ABL1* dans la LMC montre que les gènes *BCR* et *ABL1* sont en proximité spatiale plus étroite dans les cellules hématopoïétiques normales (KOZUBEK *et al.*, 1997; KOZUBEK *et al.*, 1999; LUKASOVA *et al.*, 1997; NEVES *et al.*, 1999; SCHWARZ-FINSTERLE *et al.*, 2005). D'autres exemples illustrent bien ce phénomène comme : les gènes *PML* et *RARA* dans la leucémie promyélocytaire qui sont plus fréquemment en proximité étroite dans les cellules B normales (NEVES *et al.*, 1999); il en est de même dans le lymphome de Burkitt avec le gène *MYC* où tous ses partenaires impliqués dans ses translocations (*IGH*, *IGL* ou *IGK*) sont localisés préférentiellement à sa proximité dans les cellules B normales (ROIX *et al.*, 2003); c'est le cas aussi dans le cancer de la thyroïde où une étroite proximité est observée entre les gènes sujets à translocation avant la survenue de cette translocation tandis que ces gènes sont à part dans les lymphocytes normaux et les cellules épithéliales mammaires (GANDHI *et al.*, 2006; MEABURN *et al.*, 2007; NIKIFOROVA *et al.*, 2000; ROCCATO *et al.*, 2005).

3.3.5. : Translocations et délétions chromosomiques dans les oligodendrogliomes

Cependant même si ces translocations expliquent comment les délétions entières ou partielles des bras chromosomiques se produisent dans les oligodendrogliomes, elles n'expliquent pas par contre comment les délétions interstitielles ou terminales voient le jour dans ces mêmes tumeurs. Comme les télomères jouent un rôle fondamental dans l'organisation spatiale du noyau et que l'érosion des télomères par la perte du complexe shelterin est reconnue comme cassure bicaténaire de l'ADN, nous pensons que les télomères seraient aussi impliqués dans la survenue de délétions dans les tumeurs notamment les délétions interstitielles ou terminales fréquemment retrouvées dans les oligodendrogliomes. Cette hypothèse est appuyée par les zones critiques de délétions interstitielles sur le chromosome 1 (1p36) et sur le chromosome 19 (19q13) qui sont subtélomériques. Ainsi la voie des télomères demeure une piste sérieuse pour expliquer la survenue de délétions interstitielles ou terminales sur les chromosomes 1p et 19q dans les oligodendrogliomes. Des travaux de mesure des télomères individuels à l'échelle chromosomique dans les oligodendrogliomes suivant le modèle publié sur la LMC (SAMASSEKOU *et al.*, 2009) sont actuellement en cours dans le laboratoire. Cette étude comprend également la recherche de la télomérase et des mécanismes ALT pour pouvoir déterminer la dynamique de l'évolution des télomères et leur mécanisme de régulation dans les oligodendrogliomes (travaux en cours).

3.4. Télomeres et organisation télomérique nucléaire comme biomarqueurs dans les gliomes

Malgré les nombreux biomarqueurs testés dans les glioblastomes, aucun n'arrive à monitorer l'ensemble des patients (chapitre 2, article 1). En effet, bien qu'étant considéré comme une entité, les glioblastomes ont une présentation histopathologique multiforme d'où leur nom. Cette présentation multiforme explique pourquoi il est difficile de trouver un biomarqueur qui s'appliquerait à tous les GBM. Nous avons identifié par nos travaux que l'architecture télomérique nucléaire permettait de classer les GBM en trois catégories cliniques et biologiques de GBM qui étaient encore jusqu'à présent, inconnues. De nos résultats, nous pouvons penser que l'organisation télomérique nucléaire pourrait être un biomarqueur pour tous les glioblastomes, ce qui faisait défaut jusqu'à présent. Pour cela, la mesure de cette organisation télomérique nucléaire devrait remplir les critères de biomarqueur décrits ci-dessus. Les deux méthodes (TeloView et TeloScan) développées et utilisées sont précises et sensibles et donnent les mêmes résultats (voir chapitre 2, article 1). L'organisation nucléaire est également spécifique comme nous l'avons constaté dans les différents cancers étudiés mais aussi par comparaison entre le tissu cancéreux et le tissu normal (formation d'agrégats télomériques) (CHUANG *et al.*, 2004; GUFFEI *et al.*, 2007; GUIJON *et al.*, 2007; KNECHT *et al.*, 2009; LOUIS *et al.*, 2005; MAI et GARINI, 2006). Il est évident que chaque tissu normal ou cancéreux présente une organisation nucléaire télomérique qui lui est propre. La quantification du nombre de télomères et du nombre d'agrégats télomériques ainsi que leur disposition nucléaire est facile avec

ces deux méthodes dont l'une (TeloScan) est semi-automatique et fonctionne à haut débit. Le coût est abordable puisqu'une fois l'appareillage acquis, il ne reste que les sondes PNA à pourvoir dont le coût est inférieur aux autres sondes commerciales.

Nous avons utilisé ce biomarqueur pour voir s'il pouvait prédire la récurrence dans les GBM. Nous avons étudié 12 patients disponibles dans notre cohorte dont nous avons eu les échantillons à la première chirurgie et à la récurrence. Le début d'analyse des résultats montre une évolution cellulaire des GBM passant d'une catégorie telle que définie dans l'article 1 du chapitre 2 à une autre catégorie ou récidivant dans la même catégorie (GADJI et al. article #1 en préparation).

La même étude menée dans les oligodendrogliomes montre que les récurrences surviennent par deux voies dans cette tumeur :

- par amplification du gène *MYC* qui stimule une instabilité génomique entraînant une récurrence à court terme ou
- par une repopulation de la tumeur dans les récurrences à long terme sans amplification du gène *MYC*. Nous pensons que cette repopulation serait le fait des cellules souches cancéreuses qui après quelques années et sous l'effet des stimulations par les traitements adjuvants se remettent à se diviser et à redonner la même tumeur. Cependant, cette hypothèse reste encore à être vérifiée (GADJI et al. article #2 en préparation).

Tous ces résultats appuient la validité de ce biomarqueur dans les gliomes pour la mesure de l'instabilité génomique. Les deux méthodes que nous avons utilisées

permettent facilement de quantifier l'instabilité génomique qui est la caractéristique fondamentale des tumeurs et particulièrement des tumeurs solides comme les glioblastomes.

3.5. Instabilité génomique et glioblastome

3.5.1 : Définition de l'instabilité génomique

L'instabilité génomique peut être définie par une instabilité chromosomique (CIN) et/ou une instabilité des microsatellites (MIN) allant jusqu'à une instabilité à l'échelle du nucléotide (NIN ou instabilité associée à la réparation par excision de nucléotides). L'instabilité chromosomique ou CIN implique une instabilité chromosomique numérique (nCIN) et une instabilité chromosomique structurale (sCIN). Cette sCIN se manifeste à l'échelle chromosomique par des anomalies structurales et des réarrangements des chromosomes (sCIN); par contre nCIN est marquée par une aneuploïdie c'est-à-dire des pertes et des gains de chromosomes ou segments de chromosomes entraînant une variation du nombre de chromosomes (nCIN) (BAYANI *et al.*, 2007; HANAHAN et WEINBERG, 2000; LI *et al.*, 2000; RAJAGOPALAN et LENGAUER, 2004; RASNICK et DUESBERG, 1999). Les deux formes d'instabilité chromosomique (sCIN et nCIN) sont associées en général dans une même tumeur solide et ce phénomène est dénommé aneuploïdie (HANAHAN et WEINBERG, 2000; LI *et al.*, 2000; RAJAGOPALAN et LENGAUER, 2004; RASNICK et DUESBERG, 1999). La deuxième forme d'instabilité des microsatellites se caractérise par des substitutions de base, de délétions ou insertions de très peu de nucléotides ou une instabilité des

microsatellites dont la résultante est le changement de fonction de gènes. L'instabilité génomique est une caractéristique fondamentale des tumeurs et plus particulièrement des tumeurs solides. Les gliomes ne sont pas en reste car les gliomes de haut grade de malignité (III et IV) présentent une forte instabilité génomique (HANAHAN et WEINBERG, 2000; KLEIHUES et OHGAKI, 1999; LENGAUER *et al.*, 1998; SPIEGL-KREINECKER *et al.*, 2007). Cette instabilité apparaît ainsi comme une différence fondamentale entre une cellule normale et une cellule maligne car la cellule normale est stable sur le plan génomique.

3.5.2 : Mesures de l'instabilité génomique

Plusieurs approches et outils peuvent être utilisés pour caractériser cette instabilité génomique allant du caryotype jusqu'au nucléotide (SNP-array). Dans les tumeurs solides comme les gliomes, les difficultés de les cultiver et d'obtenir de bonnes métaphases après récolte, poussent davantage les chercheurs à utiliser les outils génomiques. Nous avons réussi à les mettre en culture et à développer une méthode efficace de les récolter pour obtenir une résolution des chromosomes avoisinant les 350 voire 500 bandes. Au total nous avons réussi à faire le caryotype de 25 glioblastomes. Nous avons remarqué que les glioblastomes montrent presque toujours une polyploidisation (tri ou tétraploïdie) de la tumeur et en même temps une aneuploïdie (perte et gain de chromosomes ou segment de chromosomes). Nous en concluons que l'instabilité chromosomique ou aneuploïdie est la locomotive de la malignité dans les glioblastomes (GADJI *et al.*, 2008a; GADJI *et al.*, 2008b; GADJI *et al.* article #1 en préparation). Par contre pour les oligodendrogliomes nous avons réussi à caryotyper 17 oligodendrogliomes. Ces derniers ont montré une certaine

stabilité chromosomique car seul deux cas d'oligoastrocytomes ont montré une polyploidisation et un cas a montré des réarrangements chromosomiques (GADJI *et al.* article #2 en préparation). Il est établi que la survenue d'une polyploidisation d'un oligodendrogliome est un marqueur de mauvais pronostic même en présence de la délétion 1p/19q (chapitre 1, article 2) (SNUDERL *et al.*, 2009). Nous remarquons ainsi qu'un oligodendrogliome pur semble ne pas présenter de polyploidisation, ce qui en fait une tumeur avec un caryotype stable. C'est peut-être cela plutôt que la délétion 1p/19q qui leur permettrait de bien répondre aux traitements chimiothérapeutiques adjuvants.

3.5.3. : Causes de l'instabilité génomique

L'aneuploïdie est aussi fréquemment retrouvée dans les autres tumeurs solides (BAYANI *et al.*, 2005; BAYANI *et al.*, 2007; CAHILL *et al.*, 1999; CAHILL *et al.*, 1998; GIARETTI, 1997; KLEIN *et al.*, 2006; KOPS *et al.*, 2005; LENGAUER *et al.*, 1997; LENGAUER *et al.*, 1998; RAJAGOPALAN *et* LENGAUER, 2004). Elle entraîne une perturbation de la régulation du cycle cellulaire et des mécanismes de ségrégation des chromosomes (GIARETTI, 1997). Pour assurer une haute fidélité de la transmission des chromosomes de la cellule mère aux cellules filles, les processus mitotiques requièrent une régulation étroite de l'orientation des kinétochores et de la cohésion des centromères (WATANABE *et* NURSE, 1999). Le dysfonctionnement des centrosomes qui sont le centre primaire d'organisation des microtubules dans les cellules animales, apparaît être l'élément commun dans la chaîne d'évènements associés avec la perte de fidélité de la ségrégation des chromosomes (BRINKLEY, 2001; BRINKLEY *et* GOEPFERT, 1998; DOXSEY,

2001; DOXSEY, 2001; LINGLE et SALISBURY, 2000; MARX, 2001; PIHAN et DOXSEY, 1999; PIHAN *et al.*, 1998; WINEY, 1999). Des centrosomes anormaux sont fréquemment rapportés dans un grand nombre de cancers comme les cancers du poumon, du sein, de la prostate, du cerveau et du colon (LINGLE et SALISBURY, 1999; LINGLE et SALISBURY, 2000; LINGLE *et al.*, 1998; LINGLE *et al.*, 2002; PIHAN et DOXSEY, 1999; PIHAN *et al.*, 1998). En utilisant des lignées cellulaires, il a été montré que l'amplification du centrosome conduit au développement du cancer du sein (LINGLE *et al.*, 2002) et du cancer colorectal (GHADIMI *et al.*, 2000). D'ailleurs il a été montré que les cellules endothéliales associées avec les tumeurs sont aussi aneuploïdes et contiennent un nombre multiple anormal de centrosomes (HIDA *et al.*, 2004). Les voies moléculaires de l'aneuploïdie sont connues à partir d'expériences sur les animaux qui montrent une expression réduite des gènes du point de contrôle (checkpoint) du fuseau mitotique à savoir *MAD1*, *MAD2*, *BUBR1*, *BUB1* et *BUB3*. Une délétion complète de ces gènes est uniformément létale chez l'animal mais leur expression réduite entraîne la survie de ces animaux avec une fréquence élevée de développer une aneuploïdie. D'autres voies peuvent être perturbées par mutations qui entraînent des altérations des fonctions de leurs gènes et entraîner la survenue d'aneuploïdie à savoir le point de contrôle G1/S (Cycline E et CDC4); la réparation de l'ADN (ATM, BRCA1 et BRCA2) et la surexpression de Aurora A qui accompagne le dysfonctionnement du centrosome (BABU *et al.*, 2003; BAKER *et al.*, 2004; KOPS *et al.*, 2005; MICHEL *et al.*, 2001; RAJAGOPALAN et LENGAUER, 2004; WEAVER et CLEVELAND, 2007).

3.5.4. : Conséquences de l'instabilité génomique

Mais qui de l'aneuploïdie et de la tétraploïdisation génère l'autre? Ce qui est montré dans la littérature médicale est que l'aneuploïdie suit un état intermédiaire de tétraploïdisation (BURHOLT *et al.*, 1989; CHANG *et al.*, 2006; GALIPEAU *et al.*, 1996; SHACKNEY *et al.*, 1989). C'est ce qui semble être le cas aussi des glioblastomes que nous avons étudiés dans notre cohorte (GADJI *et al.*, 2008a; GADJI *et al.*, 2008b). Cette instabilité génomique est étroitement associée au devenir clinique du patient et est souvent considérée comme un marqueur de mauvais pronostic (IDBAIH *et al.*, 2009) comme c'est le cas dans l'article 2 du chapitre 1. Il est évident que l'instabilité génomique est un moyen efficace pour les cellules tumorales d'augmenter le dosage de gènes afin de promouvoir la croissance cellulaire comme les oncogènes et de diminuer le dosage de gènes qui la contrôlent ou qui la régulent négativement comme les gènes suppresseurs de tumeurs.

Ainsi l'instabilité chromosomique facilite l'évolution inexorable d'un cancer à travers différents stades qui supportent la croissance cellulaire tumorale, la dissémination des cellules cancéreuses et la résistance au traitement (CAHILL *et al.*, 1999; LENGAUER *et al.*, 1997; LENGAUER *et al.*, 1998; PIHAN et DOXSEY, 1999; PIHAN *et al.*, 1998). L'instabilité chromosomique accélère le taux de LOH de gènes suppresseurs de tumeurs et/ou amplifie effectivement un oncogène en multipliant le chromosome où il se situe (KOST-ALIMOVA *et al.*, 2007; RAJAGOPALAN et LENGAUER, 2004). Actuellement deux hypothèses existent quant à la place de l'instabilité génétique dans les tumeurs à savoir si elle en est une cause ou une conséquence. Dans le cancer colorectal (YANG *et al.*, 2006) et le cancer du pancréas (MOSKOVITZ *et al.*, 2003), les études ont montré que

l'instabilité génomique précède la tumorigenèse. Au contraire il est établi que les mutations sur le gène *RBI* initient le cancer du rétinoblastome (LOHMANN et GALLIE, 2004).

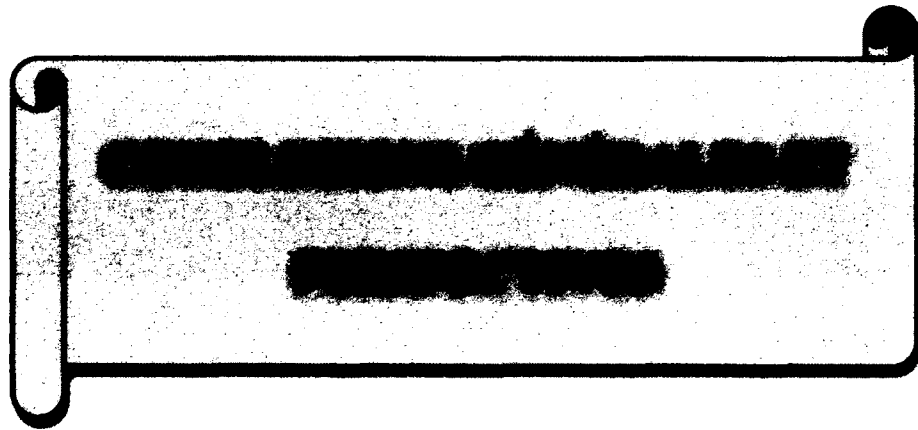
En définitive, il semble clair que les différents cancers suivent des voies alternatives différentes d'initiation. Les différentes étapes de la tumorigenèse dépendent du type de cancer et du moment où on l'étudie dans la progression de la maladie. Les deux théories ne sont pas exclusives mais complémentaires car se retrouvant à différents stades dans la majorité des processus cancéreux (HANAHAHAN et WEINBERG, 2000; LOEB *et al.*, 2003). C'est ainsi qu'on retrouve d'emblée une instabilité génétique dans les glioblastomes primaires tandis que les glioblastomes secondaires suivent la théorie mutationnelle. La connaissance de ces différentes voies moléculaires d'initiation et de progression des tumeurs permet de rechercher des molécules (médicaments) capables de les bloquer et donc de tuer ou de freiner l'évolution du cancer. Elle permet aussi de comprendre la survenue de résistance aux traitements et l'inefficacité de certains protocoles thérapeutiques. Toutes ces connaissances facilitent le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques qui permettraient d'éradiquer les cancers.

3.6. Nouvelles stratégies thérapeutiques dans les gliomes

Les nouvelles approches thérapeutiques sont justifiées par la faible efficacité des traitements traditionnels à savoir la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie dans le traitement des gliomes. Ce traitement est resté décevant du au caractère très infiltrant de ces tumeurs et une relative résistance aux traitements adjuvants. De

nouvelles approches thérapeutiques ont vu le jour basées sur la compréhension biologique et moléculaire de ces tumeurs (chapitre 3, article 1). La voie la plus ciblée concerne la surexpression du récepteur de EGF et l'activation des voies de transduction du signal qui en découlent que sont les voies *Ras/Raf*, *mTor* et *PI3K/Akt*. De plus la croissance des tumeurs cérébrales et le degré de malignité sont liés à la capacité de néovascularisation de ces tumeurs. Ce qui a entraîné l'utilisation de nouveaux agents anti-angiogéniques dont le récepteur du VEGF en est la molécule clé. Cependant devant l'inefficacité de cibler une seule voie thérapeutique, une approche pour cibler en même temps plusieurs voies est de plus en plus d'actualité. Une vue générale montre que les thérapeutiques ciblées sont dirigées contre l'activité kinase d'oncogènes dominants et/ou de récepteurs de facteurs de croissance. D'autres voies existent à savoir les inhibiteurs des protéases pour bloquer la migration des cellules tumorales et l'utilisation des inhibiteurs de la télomérase. Malgré la disponibilité de ces nouvelles drogues et les différentes approches thérapeutiques, la survie des patients ayant un gliome n'est que légèrement améliorée due à la résistance de ces tumeurs à ces agents. Cette résistance a été attribuée aux cellules souches cancéreuses qui continuent de repeupler la tumeur. Ces cellules constituent un sujet de controverse en ce sens que certains auteurs pensent que ce sont des cellules souches cancéreuses tandis que d'autres arguent que ce sont des cellules cancéreuses qui réacquièrent des propriétés de cellules souches (CLARKE, 2004; DIRKS, 2006; GUPTA *et al.*, 2009). En définitive, le fait est que ces cellules existent et ont des propriétés de cellules souches à savoir la capacité de s'autorenouveler et la capacité de se différencier. En plus elles semblent être organisées de manière hiérarchique comme dans les cellules

souches hématopoïétiques (DIRKS, 2008; SULMAN *et al.*, 2008). Elles peuvent constituer jusqu'à 25% des cellules cancéreuses à l'intérieur de certains cancers (GUPTA *et al.*, 2009). C'est pourquoi, trouver les voies et moyens permettant d'éliminer ces cellules souches cancéreuses serait une meilleure approche thérapeutique pour éradiquer les cancers.



Conclusions générales et perspectives

En initiant et conduisant ce projet, nous nous sommes fixés un certain nombre d'objectifs décrits aux pages 41 à 46. Nous avons investigué des tumeurs cérébrales prélevées chez des patients pris en charge au CHUS. Nos travaux ont abouti aux conclusions et perspectives suivantes :

▼ Les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes

☛ Nous avons recueilli de manière prospective des échantillons d'oligodendrogliomes et d'oligoastrocytomes avec lesquels nous avons confectionné en moyenne 10 lames d'empreintes cellulaires ou « touch preparation » qui sont fixées et gardées à -20°C.

☛ Nous avons utilisé certaines de ces lames pour faire la technique FISH pour la recherche des délétions 1p et 19q.

☛ De la même manière nous avons réussi à appliquer la technique FISH sur des coupes de tissu de tumeurs oligodendrogliales archivées de patients traités au CHUS en vue de rechercher les délétions 1p et 19q rétrospectivement.

☛ Nous avons déterminé le seuil de positivité de la technique FISH de détermination des délétions 1p et 19q en utilisant ces lames d'empreintes cellulaires. Ce seuil est de 20% c'est à dire qu'il faut qu'au moins 20% des cellules sur la lame d'empreinte cellulaire présentent la délétion 1p ou 19q pour conclure à la présence de la délétion.

☛ L'utilisation de ces deux types de méthodes (lames par empreintes et coupes de tissu) nous a permis de les comparer et de dégager les avantages de la technique par empreintes par rapport à la technique des coupes de tissu.

☛ Pour être certain de ne pas manquer les délétions interstitielles 1p et 19q, nous avons utilisé la technique de génétique moléculaire LOH ou perte d'hétérozygotie pour rechercher ces délétions 1p et 19q. Ce qui nous a permis de les cartographier pour déterminer les points de cassures. Nous avons ainsi fait le choix des marqueurs à utiliser. L'ADN a été extrait prospectivement à partir du fragment de biopsie de la tumeur ou rétrospectivement à partir de coupes de tissu. Nous avons aussi utilisé de l'ADN extrait à partir du sang et de la salive. Cette technique nous a permis de définir les différents loci délétés et de préciser l'étendue des délétions dans chaque tumeur. C'est aussi une bonne technique pour rechercher des gènes suppresseurs de tumeur délétés.

☛ Mettant à profit les conclusions de notre étude sur les oligodendrogliomes, nous avons développé une stratégie rapide, efficace et reproductible pour déterminer la présence de la délétion 1p et 19q dans les cellules tumorales. Il s'agit en fait de :

- recueillir au moment de la chirurgie une biopsie de tumeur et de sang ou salive chez tout patient suspecté d'avoir un oligodendrogliome ou un oligoastrocytome.
- Confectionner des lames par empreintes.
- Faire la technique FISH avec les sondes appropriées.

Cette méthode permet d'avoir le résultat 24 heures après chirurgie. Ainsi les chirurgiens pourront rapidement choisir le traitement adjuvant le plus approprié.

Si la FISH est négative alors il faut faire la technique LOH, après extraction de l'ADN du sang ou de la salive et de la tumeur du patient, avec des marqueurs microsatellites sur le 1p et le 19q choisis au niveau de chaque région chromosomique.

Nous avons aujourd'hui transférée cette méthode au laboratoire de génétique clinique pour l'intégration de la recherche de ces délétions en routine.

☛ La corrélation des résultats de notre recherche des délétions 1p et 19q nous a permis de mettre en évidence que tous les oligodendrogliomes purs dans notre cohorte présentaient ces délétions.

☛ C'est ainsi que nous avons mis en évidence le caractère de marqueur diagnostique des oligodendrogliomes de la délétion combinée 1p et 19q en nous basant sur nos résultats et ceux de la littérature médicale.

☛ Ce travail nous a valu une invitation à écrire un chapitre de livre sur la 1p et 19q comme marqueurs diagnostiques des oligodendrogliomes. Cependant, la recherche du ou des gènes suppresseurs de tumeurs situés sur les chromosomes 1p et 19q demeure une haute priorité pour enfin comprendre les bases moléculaires des oligodendrogliomes. Ce sont ces gènes qui seraient les vrais biomarqueurs des oligodendrogliomes. Pour donner une preuve indirecte de la valeur diagnostique des délétions 1p et 19q, nous avons entamé de les rechercher dans les cellules souches

cancéreuses présentes dans les cultures primaires d'oligodendrogliomes (travaux en cours). La présence de ces délétions dans ces cellules souches cancéreuses signifierait qu'elles sont à la base de la survenue des oligodendrogliomes en favorisant la prolifération des cellules souches pour donner un oligodendrogliome. Si ces délétions sont absentes de ces cellules souches alors cela signifierait qu'elles sont un événement secondaire qui orienterait davantage les cellules souches à donner un oligodendrogliome.

➤ Pour caractériser sur le plan cytogénétique ces tumeurs nous avons mis au point une technique de culture cellulaire et de récolte pour obtenir des métaphases analysables des oligodendrogliomes et oligoastrocytomes. Nous avons réussi à obtenir des chromosomes avec une bonne résolution qui parfois avoisinait les 500 bandes par génome haploïde.

➤ Ceci nous a permis de déterminer les caryotypes de ces tumeurs oligodendrogliales ou oligoastrocytaires. L'analyse de ces caryotypes nous a montré que ces tumeurs étaient relativement stables.

. ➤ En effet, seuls deux cas d'oligoastrocytomes ont montré une polyploïdisation et un cas a montré des réarrangements chromosomiques. Nous avons aussi remarqué qu'un oligodendrogliome pur semble ne pas faire de polyploïdisation et c'est peut-être cela plutôt que la délétion 1p/19q qui leur permet de bien répondre aux traitements adjuvants. Cependant nous avons aussi noté que la survenue d'une polyploïdisation de ces tumeurs est un marqueur de mauvais pronostic.

➤ En plus cette analyse des caryotypes de ces tumeurs nous a permis de rechercher si des anomalies chromosomiques pourraient être à l'origine de ces délétions. Nous avons ainsi trouvé une autre translocation chromosomique qui pourrait être à l'origine de la délétion 1p. En effet, cette translocation que nous avons observée expliquerait comment la délétion du seul chromosome 1p serait survenue dans une tumeur oligoastrocytaire. Cependant les deux mécanismes conduisant à la délétion combinée 1p/19q et 1p seul n'expliquent pas pour autant les délétions interstitielles ou terminales observées dans ces tumeurs. Nous pensons que l'érosion des télomères, par la perte de protéines protectrices exposant les télomères comme des cassures bicaténaires, pourrait être à l'origine de ces délétions. Pour vérifier cette hypothèse nous avons entamé des travaux de mesure des télomères individuellement à l'échelle chromosomique sur les métaphases obtenues à partir de la mise en culture et de la récolte de ces tumeurs. Nous pensons que les chromosomes 1p et 19q auraient les télomères les plus courts. Ces travaux sont en cours dans le laboratoire.

➤ Pour mieux caractériser sur le plan moléculaire ces tumeurs, nous avons déterminé le statut des gènes *TP53*, *MYC* et *PTEN* en utilisant la technique FISH avec les sondes spécifiques à ces gènes sur nos lames de TP. Nous n'avons pas observé de profil particulier de ces gènes. Cependant, la polysomie (un nombre de copie supérieur ou inférieur à 2) des gènes *TP53* et *PTEN* est le reflet d'une polyploïdisation de la tumeur qui est un marqueur de mauvais pronostic de la tumeur. Il en est de même que l'amplification du gène *MYC* qui entraînerait une instabilité génomique.

☛ Nos résultats ont montré la supériorité des marqueurs génétiques comme les délétions 1p et 19q sur les marqueurs pathologiques. Cependant la combinaison de la recherche de ces délétions et du diagnostic pathologique permet une meilleure prise en charge des patients atteints de ces tumeurs.

▼ **Les astrocytomes et les glioblastomes**

☛ Nous avons utilisé la technique « TeloView » qui a été développée et validée dans le laboratoire du Dr Mai à Winnipeg pour investiguer l'architecture nucléaire en trois dimensions de nos tumeurs GBM. Ainsi, nous avons pu déterminer l'architecture nucléaire télomérique et la formation des agrégats télomériques dans les GBM.

☛ De même nous avons utilisé une deuxième technique en cours de validation dans ce même laboratoire pour étudier l'architecture nucléaire télomérique et la formation d'agrégats télomériques dans les GBM.

☛ L'utilisation de ces deux techniques « TeloView » et « TeloScan » pour étudier l'organisation en trois dimensions des télomères et la formation d'agrégats télomériques dans les glioblastomes, nous ont permis de les comparer et de dégager les avantages de l'une par rapport à l'autre. Cependant malgré les avantages de la technique « TeloScan » en terme de plus grand nombre de noyaux à analyser et la semi-automaticité de cette technique (gain de temps), nos résultats obtenus par ces deux techniques ont été identiques. Le processus de validation de la technique « TeloScan » est en cours. De plus, nous avons aussi montré un moyen simple et efficace d'utilisation de ce biomarqueur en clinique pour permettre une meilleure

prise en charge médicale des patients atteints de gliomes. Cette méthode semi-automatique permet d'établir l'organisation nucléaire en trois dimensions 9 heures après réception de l'échantillon. Cette technique pourrait être facilement transférable en clinique.

☛ Nous avons montré que les GBM présentaient une signature télomérique nucléaire spécifique permettant de les classer dans trois catégories biologiques et cliniques distinctes.

☛ C'est la première étude du genre qui a réussi à montrer les GBM en trois entités cliniques significativement différentes. Cette catégorisation n'est pas possible avec les résultats de la pathologie, ni avec les autres biomarqueurs déjà publiés. Ainsi l'étude de l'organisation en trois dimensions des télomères au sein du noyau de la cellule tumorale nous a permis de trouver un biomarqueur fiable et général qui s'applique à tous les gliomes. C'est pourquoi, nous avons entrepris des études de validation de ce biomarqueur sur un nombre plus important de patients. Nous allons également comparer notre biomarqueur aux statuts des gènes *IDH1* et *2* et de *MGMT* (voir Introduction, page 39) de nos échantillons. Ainsi ce biomarqueur pourrait être utilisé pour évaluer l'efficacité des nouvelles thérapies moléculaires ciblées. Ce travail nous a valu une invitation à écrire un chapitre de livre sur l'organisation télomérique nucléaire comme biomarqueur dans les gliomes.

☛ La détermination de l'architecture nucléaire en trois dimensions est également un moyen de mesurer l'instabilité génomique. Nous avons pu dégager la place de l'instabilité génomique dans les GBM.

☛ Nous avons utilisé ce biomarqueur pour définir les bases cellulaires et moléculaires de la survenue de la récurrence aussi bien dans les GBM que dans les oligodendrogliomes. Les résultats sont en cours d'analyse pour être publiés sous peu.

☛ Nous pensons maintenant nous atteler à essayer de comprendre l'organisation en trois dimensions des télomères dans les gliomes et aussi de comprendre les mécanismes de formation des agrégats télomériques. La compréhension des bases moléculaires de cette organisation et de la formation des agrégats télomériques dégagerait de nouvelles pistes thérapeutiques intéressantes. Nous pensons qu'inhiber une ou plusieurs protéines du complexe shelterin pourrait clarifier cette organisation et la formation d'agrégats télomériques.

✓ Traitement et nouvelles stratégies thérapeutiques des tumeurs cérébrales (annexe)

Le but entre autres de toute investigation génétique des tumeurs est de mieux les comprendre sur le plan moléculaire pour trouver des traitements appropriés efficaces. Nos résultats de recherche, par la compréhension des bases moléculaires et génétiques de la formation des agrégats télomériques et aussi de la dynamique d'organisation nucléaire des cellules tumorales et des télomères, pourraient dégager de nouvelles pistes thérapeutiques. C'est pourquoi, nous avons revisité les nouvelles options thérapeutiques des gliomes qui sont en cours de développement à travers divers essais cliniques et nous avons essayé de comprendre les mécanismes de résistances à l'origine de certains échecs thérapeutiques.

➤ Nous avons d'abord cerné les traitements traditionnels et standards utilisés contre les tumeurs cérébrales et les mécanismes de leur impact sur le devenir du patient. La résistance à ces traitements a été aussi décrite.

➤ Pour pallier à ces résistances, de nouvelles stratégies thérapeutiques moléculaires ciblées ont été mises en œuvre. Nous avons essayé de dégager leur importance et leur impact dans le devenir du patient. Un constat en est le manque de marqueurs biologiques fiables pour évaluer ces traitements. En définitive, ces traitements n'améliorent pas considérablement le devenir du patient. Une des molécules les plus ciblées dans les GBM est le EGFR et ses variants.

➤ Nous avons décrit la structure moléculaire de EGFR et de ses variants. Nous avons caractérisé chaque variant et défini son impact dans les GBM.

➤ Nous avons décrit tous les médicaments mis au point pour cibler EGFR et ses variants. Les différents essais cliniques terminés ou en cours ont été évalués par la définition de leur but et par l'analyse de leur résultats et impact clinique.

➤ Nous avons revu la résistance aux traitements des GBM en montrant comment les cellules souches cancéreuses en seraient des éléments essentiels. Ceci nous a amené aussi à dégager les nouvelles idées de cibler les cellules souches dans les nouvelles options thérapeutiques. De plus, nous avons aussi décrit la combinaison de différentes molécules pour bloquer différentes voies d'induction du signal dans les GBM pour un meilleur succès thérapeutique.

✱ Nos travaux de recherche nous ont permis de mettre au point et/ou d'utiliser plusieurs techniques de cytogénétique et de génétique moléculaire pour investiguer les tumeurs cérébrales. Ainsi nous avons pu identifier certaines anomalies chromosomiques, génétiques et moléculaires qui pourraient être à la base de la survenue des tumeurs cérébrales primaires en vue de les utiliser comme marqueurs de diagnostic, de suivi du traitement et comme cibles de nouvelles stratégies thérapeutiques pour combattre ces dites tumeurs. Enfin, nous avons recueilli des échantillons de tumeurs cérébrales au moment de la chirurgie. Le chirurgien nous appelait à venir le rejoindre au niveau du bloc opératoire dès qu'il avait entamé l'exérèse chirurgicale de la tumeur. Il nous donnait un fragment de la tumeur que nous divisions en trois parties. Une partie que nous utilisions pour mettre en culture la tumeur, la seconde partie était plongée dans une solution de RNAlater pour conserver l'ARN en vue d'une utilisation future en génomique fonctionnelle et enfin la troisième partie servait à confectionner les lames de TP. Nous avons ainsi monté une biobanque appelé « glioma-bank » au CHUS qui contient actuellement plus de 150 échantillons de patients que nous continuons encore à peupler de nouveaux cas.

Bibliographie

- Addona T.A., Abbatiello S.E., Schilling B., Skates S.J., Mani D.R., Bunk D.M., Spiegelman C.H., Zimmerman L.J., Ham A.J., Keshishian H., Hall S.C., Allen S., Blackman R.K., Borchers C.H., Buck C., Cardasis H.L., Cusack M.P., Dodder N.G., Gibson B.W., Held J.M., Hiltke T., Jackson A., Johansen E.B., Kinsinger C.R., Li J., Mesri M., Neubert T.A., Niles R.K., Pulsipher T.C., Ransohoff D., Rodriguez H., Rudnick P.A., Smith D., Tabb D.L., Tegeler T.J., Variyath A.M., Vega-Montoto L.J., Wahlander A., Waldemarson S., Wang M., Whiteaker J.R., Zhao L., Anderson N.L., Fisher S.J., Liebler D.C., Paulovich A.G., Regnier F.E., Tempst P. and Carr S.A. (2009). Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma. *Nat Biotechnol* **27**(7): 633-41.
- Alonso M.E., Bello M.J., Gonzalez-Gomez P., Lomas J., Arjona D., de Campos J.M., Kusak M.E., Sarasa J.L., Isla A., Rey J.A. (2001). Mutation analysis of the p73 gene in nonastrocytic brain tumours. *Br J Cancer* **85**: 204–8
- Aten J.A., Stap J., Krawczyk P.M., van Oven C.H., Hoebe R.A., Essers J. and Kanaar R. (2004). Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* **303**(5654): 92-5.
- Babu J.R., Jeganathan K.B., Baker D.J., Wu X., Kang-Decker N. and van Deursen J.M. (2003). Rael is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation. *J Cell Biol* **160**(3): 341-53.

- Bagby G.C. and Alter B.P. (2006). Fanconi anemia. *Semin Hematol* **43**(3): 147-56.
- Baker D.J., Jeganathan K.B., Cameron J.D., Thompson M., Juneja S., Kopecka A., Kumar R., Jenkins R.B., de Groen P.C., Roche P. and van Deursen J.M. (2004). BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat Genet* **36**(7): 744-9.
- Balmain A. (2001). Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nat Rev Cancer* **1**(1): 77-82.
- Barbashina V., Salazar P., Holland E.C., Rosenblum M.K., Ladanyi M (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. *Clin Cancer Res* **11**(3):1119-28
- Batista L.F. and Artandi S.E. (2009). Telomere uncapping, chromosomes, and carcinomas. *Cancer Cell* **15**(6): 455-7.
- Bauman J.G., Wiegant J., Borst P. and van Duijn P. (1980). A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp Cell Res* **128**(2): 485-90.
- Bayani J., Pandita A. and Squire J.A. (2005). Molecular cytogenetic analysis in the study of brain tumors: findings and applications. *Neurosurg Focus* **19**(5): E1.
- Bayani J., Selvarajah S., Maire G., Vukovic B., Al-Romaih K., Zielenska M. and Squire J.A. (2007). Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells. *Semin Cancer Biol* **17**(1): 5-18.

- Bechter O.E., Zou Y., Shay J.W. and Wright W.E. (2003). Homologous recombination in human telomerase-positive and ALT cells occurs with the same frequency. *EMBO Rep* **4**(12): 1138-43.
- Bello M.J., de Campos J.M., Vaquero J., Ruiz-Barnes P., Kusak M.E., Sarasa J.L., Rey J.A. (2000). hRAD54 gene and 1p high-resolution deletion-mapping analyses in oligodendrogliomas. *Cancer Genet Cytogenet* **116**: 142-47
- Bernheim A. (2002). [Cytogenetics, cytogenomics and cancer]. *Bull Cancer* **89**(2): 161-5.
- Bollmann F.M. (2007). Targeting ALT: the role of alternative lengthening of telomeres in pathogenesis and prevention of cancer. *Cancer Treat Rev* **33**(8): 704-9.
- Bolzan A.D. and Bianchi M.S. (2006). Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. *Mutat Res* **612**(3): 189-214.
- Bolzer A., Kreth G., Solovei I., Koehler D., Saracoglu K., Fauth C., Muller S., Eils R., Cremer C., Speicher M.R. and Cremer T. (2005). Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol* **3**(5): e157.
- Boudouresque F., Berthois Y., Martin P.M., Figarella-Branger D., Chinot O. and Ouafik L. (2005). [Role of adrenomedullin in glioblastomas growth]. *Bull Cancer* **92**(4): 317-26.
- Boulay J.S. and Merlo A. (2009). Value of 1p/19q and other LOH Markers for Brain Tumor Diagnosis, Prognosis, and Therapy. *CNS Cancer, Cancer Drug Discovery and development*. Meir E.G.V. New-York, Humana Press: 359-372.

- Bouvier, C., Bartoli, C., Aguirre-Cruz, L, Virard, I., Colin, C., Fernandez, C., Gouvernet, J., Figarella-Branger, D., (2003), Shared oligodendrocyte lineage gene expression in gliomas and oligodendrocyte progenitor cells, *J Neurosurg.* **99**: 344-50.
- Bouvier C., Roll P., Quilichini B., Metellus P., Calisti A., Gilles S., Chinot O., Fina F., Martin P.M. and Figarella-Branger D. (2004). Deletions of chromosomes 1p and 19q are detectable on frozen smears of gliomas by FISH: usefulness for stereotactic biopsies. *J Neurooncol* **68**(2): 141-9.
- Boveri T. (1902). über mehrpolige mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. *Verh Phys Med Gesellschaft Würzburg* **35**: 67-90.
- Boveri T. (1914). Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Fischer, Jena.
- Boyle S., Gilchrist S., Bridger J.M., Mahy N.L., Ellis J.A. and Bickmore W.A. (2001). The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet* **10**(3): 211-9.
- Brandes, A.A., Franceschi, E., Tosoni, A., Blatt, V., Pession, A., Tallini, G., Bertorelle, R., Bartolini, S., Calbucci, F., Andreoli, A., Frezza, G., Leonardi, M., Spagnoli, F. & Ermani, M. (2008). MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. *J Clin Oncol* **26**, 2192-7.
- Bridger J.M., Boyle S., Kill I.R. and Bickmore W.A. (2000). Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. *Curr Biol* **10**(3): 149-52.

- Brinkley B.R. (2001). Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol* **11**(1): 18-21.
- Brinkley B.R. and Goepfert T.M. (1998). Supernumerary centrosomes and cancer: Boveri's hypothesis resurrected. *Cell Motil Cytoskeleton* **41**(4): 281-8.
- Bryan T.M. and Reddel R.R. (1994). SV40-induced immortalization of human cells. *Crit Rev Oncog* **5**(4): 331-57.
- Burholt D.R., Shackney S.E., Ketterer D.M., Pollice A.A., Smith C.A., Brown K.A., Giles H.R. and Schepart B.S. (1989). Karyotypic evolution of a human undifferentiated large cell carcinoma of the lung in tissue culture. *Cancer Res* **49**(12): 3355-61.
- Cahill D.P., Kinzler K.W., Vogelstein B. and Lengauer C. (1999). Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* **9**(12): M57-60.
- Cahill D.P., Lengauer C., Yu J., Riggins G.J., Willson J.K., Markowitz S.D., Kinzler K.W. and Vogelstein B. (1998). Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* **392**(6673): 300-3.
- Carroll K.J. (2007a). Biomarkers in drug development: friend or foe? A personal reflection gained working within oncology. *Pharm Stat* **6**(4): 253-60.
- Carroll K.J. (2007b). Analysis of progression-free survival in oncology trials: some common statistical issues. *Pharm Stat* **6**(2): 99-113.
- Caspersson T., Zech L. and Johansson C. (1970). Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. *Exp Cell Res* **62**(2): 490-2.

- Cesare A.J., Kaul Z., Cohen S.B., Napier C.E., Pickett H.A., Neumann A.A. and Reddel R.R. (2009). Spontaneous occurrence of telomeric DNA damage response in the absence of chromosome fusions. *Nat Struct Mol Biol* **16**(12): 1244-51.
- Chang Y., Berenson J.R., Wang Z. and Deuel T.F. (2006). Dominant negative pleiotrophin induces tetraploidy and aneuploidy in U87MG human glioblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **351**(2): 336-9.
- Chuang T.C., Moshir S., Garini Y., Chuang A.Y., Young I.T., Vermolen B., van den Doel R., Mougey V., Perrin M., Braun M., Kerr P.D., Fest T., Boukamp P. and Mai S. (2004). The three-dimensional organization of telomeres in the nucleus of mammalian cells. *BMC Biol* **2**: 12.
- Clarke M.F. (2004). Neurobiology: at the root of brain cancer. *Nature* **432**(7015): 281-2.
- Cremer M., von Hase J., Volm T., Brero A., Kreth G., Walter J., Fischer C., Solovei I., Cremer C. and Cremer T. (2001). Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res* **9**(7): 541-67.
- Cremer M., Kupper K., Wagler B., Wizelman L., von Hase J., Weiland Y., Kreja L., Diebold J., Speicher M.R. and Cremer T. (2003). Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol* **162**(5): 809-20.
- Cremer T. and Cremer C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* **2**(4): 292-301.

- Cremer T., Cremer C., Baumann H., Luedtke E.K., Sperling K., Teuber V. and Zorn C. (1982). Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Hum Genet* **60**(1): 46-56.
- Croft J.A., Bridger J.M., Boyle S., Perry P., Teague P. and Bickmore W.A. (1999). Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol* **145**(6): 1119-31.
- Dandy W.E. (1928). Removal of the right hemisphere for certain tumours with hemiplegia. Preliminary report. *J Am Med Assoc* **90**: 823-825.
- de Lange T. (2004). T-loops and the origin of telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(4): 323-9.
- de Lange T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* **19**(18): 2100-10.
- DeAngelis L.M. (2001). Brain tumors. *N Engl J Med* **344**(2): 114-23.
- Desmaze C., Soria J.C., Freulet-Marriere M.A., Mathieu N. and Sabatier L. (2003). Telomere-driven genomic instability in cancer cells. *Cancer Lett* **194**(2): 173-82.
- Dirks P.B. (2006). Cancer: stem cells and brain tumours. *Nature* **444**(7120): 687-8.
- Dirks P.B. (2008). Brain tumor stem cells: bringing order to the chaos of brain cancer. *J Clin Oncol* **26**(17): 2916-24.
- Dong S, Pang J.C., Hu J., Zhou L.F., Ng H.K. (2002). Transcriptional inactivation of TP73 expression in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* **98**: 370-5
- Doxsey S. (2001a). Re-evaluating centrosome function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(9): 688-98.

- Doxsey S.J. (2001b). Centrosomes as command centres for cellular control. *Nat Cell Biol* **3**(5): E105-8.
- Earnest F.t., Kelly P.J., Scheithauer B.W., Kall B.A., Cascino T.L., Ehman R.L., Forbes G.S. and Axley P.L. (1988). Cerebral astrocytomas: histopathologic correlation of MR and CT contrast enhancement with stereotactic biopsy. *Radiology* **166**(3): 823-7.
- El-Jawahri A., Patel D., Zhang M., Mladkova N. and Chakravarti A. (2008). Biomarkers of clinical responsiveness in brain tumor patients : progress and potential. *Mol Diagn Ther* **12**(4): 199-208.
- Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S.N., Hidalgo, O.F., Vanaclocha, V., Baylin, S.B. & Herman, J.G. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* **343**, 1350-4.
- Everhard, S., Kaloshi, G., Criniere, E., Benouaich-Amiel, A., Lejeune, J., Marie, Y., Sanson, M., Kujas, M., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K., Delattre, J.Y. & Thillet, J. (2006). MGMT methylation: a marker of response to temozolomide in low-grade gliomas. *Ann Neurol* **60**, 740-3.
- Fleming T.P., Saxena A., Clark W.C., Robertson J.T., Oldfield E.H., Aaronson S.A. and Ali I.U. (1992). Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. *Cancer Res* **52**(16): 4550-3.
- Franco-Hernandez C., Martinez-Glez V., de Campos J.M., Isla A., Vaquero J., Gutierrez M., Casartelli C. and Rey J.A. (2009). Allelic status of 1p and 19q in oligodendrogliomas and glioblastomas: multiplex ligation-dependent

probe amplification versus loss of heterozygosity. *Cancer Genet Cytogenet* **190**(2): 93-6.

Fujisawa H., Kurrer M., Reis R.M., Yonekawa Y., Kleihues P. and Ohgaki H. (1999). Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter. *Am J Pathol* **155**(2): 387-94.

Fults D. and Pedone C. (1993). Deletion mapping of the long arm of chromosome 10 in glioblastoma multiforme. *Genes Chromosomes Cancer* **7**(3): 173-7.

Gadji M., Fortin D., Tsanaclis A.M.C., Yan J., Reddy J.J., Klonisch T., Drouin R. and Mai S. Cellular mechanisms of recurrence in Glioblastomas (article 1 ; en préparation)

Gadji M., Tsanaclis A.M.C., Fortin D., Yan J., Reddy J.J., Klonisch T., Drouin R. and Mai S. Cellular mechanisms of recurrence in oligodendrogliomas (article 2 ; en préparation)

Gadji, Fortin D., Tsanaclis A.M. and Drouin R. (Mars 2008a.). Chromosomal and molecular signatures of gliomas. Poster, . 15th Annual Clinical Genetics Meeting of American College of Medical Genetics,. Phoenix, AR,: Summary #98, p. 126, .

Gadji M., Tsanaclis A.M., Fortin D. and Drouin R. (April, 12-16, 2008b). Aneuploidy and chromosomal instability in gliomas. Poster, 101d Congress of the American Association for Cancer Research. San Diego. California. USA. . Proceedings.: résumé 4331*, p.1031.

- Galipeau P.C., Cowan D.S., Sanchez C.A., Barrett M.T., Emond M.J., Levine D.S., Rabinovitch P.S. and Reid B.J. (1996). 17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraploid) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(14): 7081-4.
- Gall J.G. and Pardue M.L. (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **63**(2): 378-83.
- Gandhi M., Medvedovic M., Stringer J.R. and Nikiforov Y.E. (2006). Interphase chromosome folding determines spatial proximity of genes participating in carcinogenic RET/PTC rearrangements. *Oncogene* **25**(16): 2360-6.
- Gartler S.M. (2006). The chromosome number in humans: a brief history. *Nat Rev Genet* **7**(8): 655-60.
- Ghadimi B.M., Sackett D.L., Difilippantonio M.J., Schrock E., Neumann T., Jauho A., Auer G. and Ried T. (2000). Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* **27**(2): 183-90.
- Gerson, S.L. (2004). MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* **4**, 296-307.
- Giaretti W. (1997). Aneuploidy mechanisms in human colorectal preneoplastic lesions and Barrett's esophagus. Is there a role for K-ras and p53 mutations? *Anal Cell Pathol* **15**(2): 99-117.
- Gollin S.M. (2007). Mechanisms leading to nonrandom, nonhomologous chromosomal translocations in leukemia. *Semin Cancer Biol* **17**(1): 74-9.

- Greider C.W. and Blackburn E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**(2 Pt 1): 405-13.
- Griffin C.A., Long P.P., Carson B.S. and Brem H. (1992). Chromosome abnormalities in low-grade central nervous system tumors. *Cancer Genet Cytogenet* **60**(1): 67-73.
- Griffin C.A., Burger P., Morsberger L., Yonescu R., Swierczynski S., Weingart J.D. and Murphy K.M. (2006). Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *J Neuropathol Exp Neurol* **65**(10): 988-94.
- Griffith J.D., Comeau L., Rosenfield S., Stansel R.M., Bianchi A., Moss H. and de Lange T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**(4): 503-14.
- Guffei A., Lichtensztejn Z., Goncalves Dos Santos Silva A., Louis S.F., Caporali A. and Mai S. (2007). c-Myc-dependent formation of Robertsonian translocation chromosomes in mouse cells. *Neoplasia* **9**(7): 578-88.
- Guijon F.B., Greulich-Bode K., Paraskevas M., Baker P. and Mai S. (2007). Premalignant cervical lesions are characterized by dihydrofolate reductase gene amplification and c-Myc overexpression: possible biomarkers. *J Low Genit Tract Dis* **11**(4): 265-72.
- Gupta P.B., Chaffer C.L. and Weinberg R.A. (2009). Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med* **15**(9): 1010-2.
- Hanahan D. and Weinberg R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70.

- Hazourli S., Chagnon P., Sauvageau M., Fetni R., Busque L. and Hebert J. (2006). Overexpression of PRDM16 in the presence and absence of the RUNX1/PRDM16 fusion gene in myeloid leukemias. *Genes Chromosomes Cancer* **45**(11): 1072-6.
- He J., Hoang-Xuan K., Marie Y., Leuraud P., Mokhtari K., Kujas M., Delattre J.Y., Sanson M. (2000). P18 tumor suppressor gene and progression of oligodendrogliomas to anaplasia. *Neurology* **55**: 867–69
- Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., Hamou, M.F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J.E., Hau, P., Mirimanoff, R.O., Cairncross, J.G., Janzer, R.C. & Stupp, R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **352**, 997-1003.
- Hida K., Hida Y., Amin D.N., Flint A.F., Panigrahy D., Morton C.C. and Klagsbrun M. (2004). Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res* **64**(22): 8249-55.
- Hoang-Xuan K., Idbaih A., Mokhtari K. and Sanson M. (2005). [Towards a molecular classification of gliomas]. *Bull Cancer* **92**(4): 310-6.
- Holmquist G.P. and Ashley T. (2006). Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. *Cytogenet Genome Res* **114**(2): 96-125.
- Husemann K., Wolter M., Buschges R., McLendon R.E. (1999). Identification of two distinct deleted regions on the short arm of chromosome 1 and rare mutation of the CDKN2C gene from 1p32 in oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**: 1041–50

- Hutchinson L. and DeVita V.T., Jr. (2009). The Holy Grail of biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* **6**(10): 553.
- Ichimura K., Schmidt E.E., Goike H.M. and Collins V.P. (1996). Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene* **13**(5): 1065-72.
- Idbaih A., Criniere E., Ligon K.L., Delattre O. and Delattre J.Y. (2009). Array-Based Genomics in Glioma Research. *Brain Pathol.* **20**(1): 28-38
- Inskip P.D., Tarone R.E., Hatch E.E., Wilcosky T.C., Shapiro W.R., Selker R.G., Fine H.A., Black P.M., Loeffler J.S. and Linet M.S. (2001). Cellular-telephone use and brain tumors. *N Engl J Med* **344**(2): 79-86.
- James C.D., Carlbom E., Dumanski J.P., Hansen M., Nordenskjold M., Collins V.P. and Cavenee W.K. (1988). Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res* **48**(19): 5546-51.
- Jenkins R.B., Kimmel D.W., Moertel C.A., Schultz C.G., Scheithauer B.W., Kelly P.J. and Dewald G.W. (1989). A cytogenetic study of 53 human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* **39**(2): 253-79.
- Jenkins R.B., Blair H., Ballman K.V., Giannini C., Arusell R.M., Law M., Flynn H., Passe S., Felten S., Brown P.D., Shaw E.G. and Buckner J.C. (2006). A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res* **66**(20): 9852-61.
- Kaghad M., Bonnet H., Yang A., Creancier L., Biscan J.C., Valent A., Minty A., Chalon P., Lelias J.M., Dumont X., Ferrara P., McKeon F., Caput D. (1997).

Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* **90**: 809–19.

Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Sudar D., Rutovitz D., Gray J.W., Waldman F. and Pinkel D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258**(5083): 818-21.

Kleihues P. and Ohgaki H. (1999). Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol* **1**(1): 44-51.

Klein A., Zang K.D., Steudel W.I. and Urbschat S. (2006). Different mechanisms of mitotic instability in cancer cell lines. *Int J Oncol* **29**(6): 1389-96.

Klinck R., Bramard A., Inkel L., Dufresne-Martin G., Gervais-Bird J., Madden R., Paquet E.R., Koh C., Venables J.P., Prinos P., Jilaveanu-Pelmus M., Wellinger R., Rancourt C., Chabot B. and Abou Elela S. (2008). Multiple alternative splicing markers for ovarian cancer. *Cancer Res* **68**(3): 657-63.

Knecht H., Sawan B., Lichtensztein D., Lemieux B., Wellinger R.J. and Mai S. (2009). The 3D nuclear organization of telomeres marks the transition from Hodgkin to Reed-Sternberg cells. *Leukemia* **23**(3): 565-73.

Kops G.J., Weaver B.A. and Cleveland D.W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* **5**(10): 773-85.

Kost-Alimova M., Darai-Ramqvist E., Yau W.L., Sandlund A., Fedorova L., Yang Y., Kholodnyuk I., Cheng Y., Li Lung M., Stanbridge E., Klein G. and Imreh S. (2007). Mandatory chromosomal segment balance in aneuploid tumor cells. *BMC Cancer* **7**: 21.

- Kozubek S., Lukasova E., Ryznar L., Kozubek M., Liskova A., Govorun R.D., Krasavin E.A. and Horneck G. (1997). Distribution of ABL and BCR genes in cell nuclei of normal and irradiated lymphocytes. *Blood* **89**(12): 4537-45.
- Kozubek S., Lukasova E., Mareckova A., Skalnikova M., Kozubek M., Bartova E., Kroha V., Krahulcova E. and Slotova J. (1999). The topological organization of chromosomes 9 and 22 in cell nuclei has a determinative role in the induction of t(9,22) translocations and in the pathogenesis of t(9,22) leukemias. *Chromosoma* **108**(7): 426-35.
- Kuttler F. and Mai S. (2007). Formation of non-random extrachromosomal elements during development, differentiation and oncogenesis. *Semin Cancer Biol* **17**(1): 56-64.
- Lengauer C., Kinzler K.W. and Vogelstein B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**(6625): 623-7.
- Lengauer C., Kinzler K.W. and Vogelstein B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**(6712): 643-9.
- Li R., Sonik A., Stindl R., Rasnick D. and Duesberg P. (2000). Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: recent study claims mutation but is found to support aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3236-41.
- Lin K.W. and Yan J. (2005). The telomere length dynamic and methods of its assessment. *J Cell Mol Med* **9**(4): 977-89.
- Lingle W.L. and Salisbury J.L. (1999). Altered centrosome structure is associated with abnormal mitoses in human breast tumors. *Am J Pathol* **155**(6): 1941-51.

- Lingle W.L. and Salisbury J.L. (2000). The role of the centrosome in the development of malignant tumors. *Curr Top Dev Biol* **49**: 313-29.
- Lingle W.L., Lutz W.H., Ingle J.N., Maihle N.J. and Salisbury J.L. (1998). Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(6): 2950-5.
- Lingle W.L., Barrett S.L., Negron V.C., D'Assoro A.B., Boeneman K., Liu W., Whitehead C.M., Reynolds C. and Salisbury J.L. (2002). Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4): 1978-83.
- Loeb L.A., Loeb K.R. and Anderson J.P. (2003). Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(3): 776-81.
- Lohmann D.R. and Gallie B.L. (2004). Retinoblastoma: revisiting the model prototype of inherited cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **129C**(1): 23-8.
- Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvet A., Scheithauer B.W. and Kleihues P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **114**(2): 97-109.
- Louis S.F., Vermolen B.J., Garini Y., Young I.T., Guffei A., Lichtensztejn Z., Kuttler F., Chuang T.C., Moshir S., Mougey V., Chuang A.Y., Kerr P.D., Fest T., Boukamp P. and Mai S. (2005). c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(27): 9613-8.
- Lu, Q.R., Park, J.K., Noll, E., Chan, J.A., Alberta, J., Yuk, D., Alzamora, M.G., Louis, D.N., Stiles, C.D., Rowitch, D.H., Black, P.M., (2001),

Oligodendrocyte lineage genes (OLIG) as molecular markers for human glial brain tumors, *PNAS* **98**: 10851-6.

Lukasova E., Kozubek S., Kozubek M., Kjeronska J., Ryznar L., Horakova J., Krahulcova E. and Horneck G. (1997). Localisation and distance between ABL and BCR genes in interphase nuclei of bone marrow cells of control donors and patients with chronic myeloid leukaemia. *Hum Genet* **100**(5-6): 525-35.

Mai M., Huang H., Reed C., Qian C., Smith J.S., Alderete B., Jenkins R., Smith D.I., Liu W. (1998a). Genomic organization and mutation analysis of p73 in oligodendrogliomas with chromosome 1p-arm deletions. *Genomics* **51**: 359–363

Mai M., Qian C., Yokomizo A., Tindall D.J., Bostwick D., Polychronakos C., Smith D.I., Liu W. (1998b). Loss of imprinting and allele switching of p73 in renal cell carcinoma. *Oncogene* **17**: 1739–41

Mai M., Yokomizo A., Qian C., Yang P., Tindall D.J., Smith D.I., Liu W. (1998c). Activation of p73 silent allele in lung cancer. *Cancer Res* **58**: 2347–49

Mai S. and Garini Y. (2006). The significance of telomeric aggregates in the interphase nuclei of tumor cells. *J Cell Biochem* **97**(5): 904-15.

Marie, Y., Sanson, M., Mokhtari, K., Leuraud, P., Kujas, M., Delattre, J.-Y., Poirie, J., Zaic, O.B., and Hoang-Xuan, K., (2001). OLIG2 as a specific marker of oligodendroglial tumour cells, *The Lancet* **358**: 298-300.

Marx J. (2001). Cell biology. Do centrosome abnormalities lead to cancer? *Science* **292**(5516): 426-9.

Matsuda M., Miyagawa K., Takahashi M., Fukuda T., Kataoka T., Asahara T., Inui

- H., Watatani M., Yasutomi M., Kamada N., Dohi K., Kamiya K. (1999). Mutations in the RAD54 recombination gene in primary cancers. *Oncogene* **18**:3427–30
- McClintock B. (1941a). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* **26**(2): 234-82.
- McClintock B. (1941b). The Association of Mutants with Homozygous Deficiencies in *Zea Mays*. *Genetics* **26**(5): 542-71.
- McKnight T.D. and Shippen D.E. (2004). Plant telomere biology. *Plant Cell* **16**(4): 794-803.
- Meaburn K.J., Misteli T. and Soutoglou E. (2007). Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol* **17**(1): 80-90.
- Meaburn K.J., Gudla P.R., Khan S., Lockett S.J. and Misteli T. (2009). Disease-specific gene repositioning in breast cancer. *J Cell Biol* **187**(6): 801-812.
- Mellai, M., Caldera, V., Annovazzi, L., Chio, A., Lanotte, M., Cassoni, P., Finocchiaro, G. & Schiffer, D. (2009). MGMT promoter hypermethylation in a series of 104 glioblastomas. *Cancer Genomics Proteomics* **6**, 219-27.
- Melino G., De L.V., Vousden K.H. (2002). p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **2**: 605–15.
- Michel L.S., Liberal V., Chatterjee A., Kirchwegger R., Pasche B., Gerald W., Dobles M., Sorger P.K., Murty V.V. and Benezra R. (2001). MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* **409**(6818): 355-9.

- Misteli T. (2008). Chromosome territories: The arrangement of chromosomes in the nucleus. *Nature Education* 1 (1).
- Miyakawa A., Ichimura K., Schmidt E.E., Varmeh-Ziaie S. and Collins V.P. (2000). Multiple deleted regions on the long arm of chromosome 6 in astrocytic tumours. *Br J Cancer* **82**(3): 543-9.
- Moskovitz A.H., Linford N.J., Brentnall T.A., Bronner M.P., Storer B.E., Potter J.D., Bell R.H., Jr. and Rabinovitch P.S. (2003). Chromosomal instability in pancreatic ductal cells from patients with chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **37**(2): 201-6.
- Muntoni A. and Reddel R.R. (2005). The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum Mol Genet* **14 Spec No. 2**: R191-6.
- Nagarajan, R. P. & Costello, J. F. (2009). Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme. *Semin Cancer Biol* **19**, 188-97.
- Nagasaka T., Gunji M., Hosokai N., Hayashi K., Ikeda H., Ito M. and Inao S. (2007). FISH 1p/19q deletion/imbalance for molecular subclassification of glioblastoma. *Brain Tumor Pathol* **24**(1): 1-5.
- Nakamura M., Watanabe T., Klangby U., Asker C., Wiman K., Yonekawa Y., Kleihues P. and Ohgaki H. (2001). p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol* **11**(2): 159-68.
- Neves H., Ramos C., da Silva M.G., Parreira A. and Parreira L. (1999). The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood* **93**(4): 1197-207.

- Newcomb E.W., Cohen H., Lee S.R., Bhalla S.K., Bloom J., Hayes R.L. and Miller D.C. (1998). Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain Pathol* **8**(4): 655-67.
- Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H. and Buchardt O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* **254**(5037): 1497-500.
- Nikiforova M.N., Stringer J.R., Blough R., Medvedovic M., Fagin J.A. and Nikiforov Y.E. (2000). Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science* **290**(5489): 138-41.
- Nishizaki T., Harada K., Kubota H., Harada K., Furuya T., Suzuki M. and Sasaki K. (2002). Chromosome instability in malignant astrocytic tumors detected by fluorescence in situ hybridization. *J Neurooncol* **56**(2): 159-65.
- Nowell P.C. and Hungerford D.A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* **25**: 85-109.
- Nowell P.C., Rowley J.D. and Knudson A.G., Jr. (1998). Cancer genetics, cytogenetics--defining the enemy within. *Nat Med* **4**(10): 1107-11.
- O'Connor C. (2008). Telomeres of human chromosomes. *Nature Education* **1** (1).
- Ohgaki, H. & Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* **170**, 1445-53.
- Parada L.A., Roix J.J. and Misteli T. (2003). An uncertainty principle in chromosome positioning. *Trends Cell Biol* **13**(8): 393-6.

- Parada L.A., McQueen P.G. and Misteli T. (2004). Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biol* **5**(7): R44.
- Parada L.A., McQueen P.G., Munson P.J. and Misteli T. (2002). Conservation of relative chromosome positioning in normal and cancer cells. *Curr Biol* **12**(19): 1692-7.
- Pardue M.L. and Gall J.G. (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **64**(2): 600-4.
- Parsons D.W., Jones S., Zhang X., Lin J.C., Leary R.J., Angenendt P., Mankoo P., Carter H., Siu I.M., Gallia G.L., Olivi A., McLendon R., Rasheed B.A., Keir S., Nikolskaya T., Nikolsky Y., Busam D.A., Tekleab H., Diaz L.A., Jr., Hartigan J., Smith D.R., Strausberg R.L., Marie S.K., Shinjo S.M., Yan H., Riggins G.J., Bigner D.D., Karchin R., Papadopoulos N., Parmigiani G., Vogelstein B., Velculescu V.E. and Kinzler K.W. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**(5897): 1807-12.
- Pegg, A. E. (2000). Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res* **462**, 83-100.
- Pellestor F., Paulasova P., Macek M. and Hamamah S. (2005). [The peptide nucleic acids (PNAs): "high-tech" probes for genetic and molecular cytogenetic investigations]. *Med Sci (Paris)* **21**(8-9): 753-8.
- Pihan G.A. and Doxsey S.J. (1999). The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Semin Cancer Biol* **9**(4): 289-302.

- Pihan G.A., Purohit A., Wallace J., Knecht H., Woda B., Quesenberry P. and Doxsey S.J. (1998). Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* **58**(17): 3974-85.
- Pohl U., Cairncross J.G., Louis D.N. (1999). Homozygous délétions of the CDKN2C/p18INK4C gene on the short arm of chromosome 1 in anaplastic oligodendrogliomas. *Brain Pathol* **9**: 639-43
- Pohl U., Smith J.S., Tachibana I., Ueki K., Lee H.K., Ramaswamy S., Wu Q., Mohrenweiser H.W., Jenkins R.B., Louis D.N. (2000). EHD2, EHD3, and EHD4 encode novel members of a highly conserved family of EH domain containing proteins. *Genomics* **63**: 255-62
- Rajagopalan H. and Lengauer C. (2004). Aneuploidy and cancer. *Nature* **432**(7015): 338-41.
- Ransom D.T., Ritland S.R., Kimmel D.W., Moertel C.A., Dahl R.J., Scheithauer B.W., Kelly P.J. and Jenkins R.B. (1992). Cytogenetic and loss of heterozygosity studies in ependymomas, pilocytic astrocytomas, and oligodendrogliomas. *Genes Chromosomes Cancer* **5**(4): 348-56.
- Rasnick D. and Duesberg P.H. (1999). How aneuploidy affects metabolic control and causes cancer. *Biochem J* **340** (Pt 3): 621-30.
- Rassool F.V. (2003). DNA double strand breaks (DSB) and non-homologous end joining (NHEJ) pathways in human leukemia. *Cancer Lett* **193**(1): 1-9.
- Ratain M.J. and Glassman R.H. (2007). Biomarkers in phase I oncology trials: signal, noise, or expensive distraction? *Clin Cancer Res* **13**(22 Pt 1): 6545-8.

- Reifenberger G., Liu L., Ichimura K., Schmidt E.E. and Collins V.P. (1993). Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* **53**(12): 2736-9.
- Rey J.A., Bello M.J., de Campos J.M., Kusak M.E. and Moreno S. (1987). Chromosomal composition of a series of 22 human low-grade gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* **29**(2): 223-37.
- Roccatto E., Bressan P., Sabatella G., Rumio C., Vizzotto L., Pierotti M.A. and Greco A. (2005). Proximity of TPR and NTRK1 rearranging loci in human thyrocytes. *Cancer Res* **65**(7): 2572-6.
- Roix J.J., McQueen P.G., Munson P.J., Parada L.A. and Misteli T. (2003). Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nat Genet* **34**(3): 287-91.
- Rowley J.D. (1973). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**(5405): 290-3.
- Rowley J.D. (2001). Chromosome translocations: dangerous liaisons revisited. *Nat Rev Cancer* **1**(3): 245-50.
- Rowley J.D. (2008). Chromosomal translocations: revisited yet again. *Blood* **112**(6): 2183-9.
- Rudkin G.T. and Stollar B.D. (1977). High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature* **265**(5593): 472-3.
- Sanson, M., Marie, Y., Paris, S., Idbaih, A., Laffaire, J., Ducray, F., El Hallani, S., Boisselier, B., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K. & Delattre, J. Y. (2009). Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic

biomarker in gliomas. *J Clin Oncol* **27**, 4150-4.

Samassekou O., Ntwari A., Hébert J. and Yan J. (2009). Individual telomere lengths in chronic myeloid leukemia. *Neoplasia* **11**(11):1146-54.

Savage J.R. (1993). Interchange and intra-nuclear architecture. *Environ Mol Mutagen* **22**(4): 234-44.

Savage J.R. (2000). Cancer. Proximity matters. *Science* **290**(5489): 62-3.

Sawyers C.L. (2008). The cancer biomarker problem. *Nature* **452**(7187): 548-52.

Schmidt M.C., Antweiler S., Urban N., Mueller W., Kuklik A., Meyer-Puttlitz B., Wiestler O.D., Louis D.N., Fimmers R. and von Deimling A. (2002). Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**(4): 321-8.

Schrock E., Blume C., Meffert M.C., du Manoir S., Bersch W., Kiessling M., Lozanowa T., Thiel G., Witkowski R., Ried T. and Cremer T. (1996a). Recurrent gain of chromosome arm 7q in low-grade astrocytic tumors studied by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **15**(4): 199-205.

Schrock E., du Manoir S., Veldman T., Schoell B., Wienberg J., Ferguson-Smith M.A., Ning Y., Ledbetter D.H., Bar-Am I., Soenksen D., Garini Y. and Ried T. (1996b). Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* **273**(5274): 494-7.

Schwarz-Finsterle J., Stein S., Grossmann C., Schmitt E., Schneider H., Trakhtenbrot L., Rechavi G., Amariglio N., Cremer C. and Hausmann M. (2005). COMBO-FISH for focussed fluorescence labelling of gene domains:

3D-analysis of the genome architecture of *abl* and *bcr* in human blood cells.

Cell Biol Int **29**(12): 1038-46.

Shackney S.E., Smith C.A., Miller B.W., Burholt D.R., Murtha K., Giles H.R.,

Ketterer D.M. and Pollice A.A. (1989). Model for the genetic evolution of human solid tumors. *Cancer Res* **49**(12): 3344-54.

Shete S., Hosking F.J., Robertson L.B., Dobbins S.E., Sanson M., Malmer B.,

Simon M., Marie Y., Boisselier B., Delattre J.Y., Hoang-Xuan K., El Hallani

S., Idbah A., Zelenika D., Andersson U., Henriksson R., Bergenheim A.T.,

Feychting M., Lonn S., Ahlbom A., Schramm J., Linnebank M., Hemminki

K., Kumar R., Hepworth S.J., Price A., Armstrong G., Liu Y., Gu X., Yu R.,

Lau C., Schoemaker M., Muir K., Swerdlow A., Lathrop M., Bondy M. and

Houlston R.S. (2009). Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat Genet* **41**(8): 899-904.

Smith J.S., Tachibana I., Pohl U., Lee H.K., Thanarajasingam U., Portier B.P., Ueki

K., Ramaswamy S., Billings S.J., Mohrenweiser H.W., Louis D.N., Jenkins

R.B. (2000). A transcript map of the chromosome 19q-arm glioma tumor suppressor region. *Genomics*. **64**(1):44-50.

Snuderl M., Eichler A.F., Ligon K.L., Vu Q.U., Silver M., Betensky R.A., Ligon

A.H., Wen P.Y., Louis D.N. and Iafrate A.J. (2009). Polysomy for

chromosomes 1 and 19 predicts earlier recurrence in anaplastic oligodendrogliomas with concurrent 1p/19q loss. *Clin Cancer Res* **15**(20):

6430-7.

Speicher M.R. and Carter N.P. (2005). The new cytogenetics: blurring the

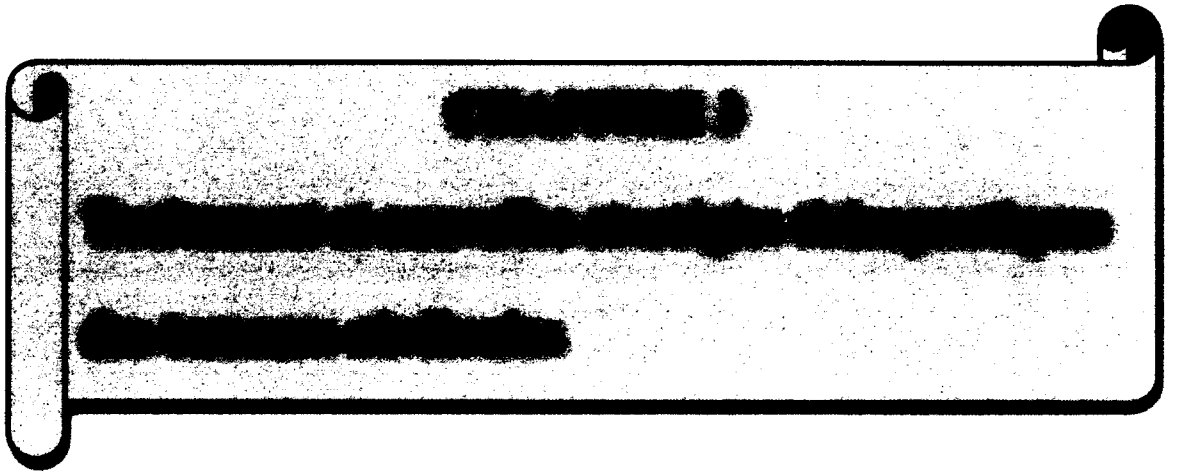
boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* **6**(10): 782-92.

- Speicher M.R., Gwyn Ballard S. and Ward D.C. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* **12**(4): 368-75.
- Spiegel-Kreinecker S., Pirker C., Marosi C., Buchroithner J., Pichler J., Silye R., Fischer J., Micksche M. and Berger W. (2007). Dynamics of chemosensitivity and chromosomal instability in recurrent glioblastoma. *Br J Cancer* **96**(6): 960-9.
- Stewart B.W. and Kleihues P.E. (2003). *World Cancer Report*. Lyon, IARC Press. 12-47
- Strick R., Zhang Y., Emmanuel N. and Strissel P.L. (2006). Common chromatin structures at breakpoint cluster regions may lead to chromosomal translocations found in chronic and acute leukemias. *Hum Genet* **119**(5): 479-95.
- Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A.A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G. & Mirimanoff, R.O. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* **10**, 459-66.
- Sulman E., Aldape K. and Colman H. (2008). Brain tumor stem cells. *Curr Probl Cancer* **32**(3): 124-42.
- Taylor A.M., Metcalfe J.A., Thick J. and Mak Y.F. (1996). Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood* **87**(2): 423-38.

- Thiel G., Losanowa T., Kintzel D., Nisch G., Martin H., Vorpahl K. and Witkowski R. (1992). Karyotypes in 90 human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* **58**(2): 109-20.
- Tischkowitz M. and Dokal I. (2004). Fanconi anaemia and leukaemia - clinical and molecular aspects. *Br J Haematol* **126**(2): 176-91.
- Tjio J. and Levan A. (1956). The chromosome number in man. *Hereditas* **42**: 1-6.
- Trask B.J. (2002). Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet* **3**(10): 769-78.
- Ueki K., Ono Y., Henson J.W., Efrid J.T., von Deimling A. and Louis D.N. (1996). CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* **56**(1): 150-3.
- Vega L.R., Mateyak M.K. and Zakian V.A. (2003). Getting to the end: telomerase access in yeast and humans. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(12): 948-59.
- Venables J.P., Klinck R., Bramard A., Inkel L., Dufresne-Martin G., Koh C., Gervais-Bird J., Lapointe E., Froehlich U., Durand M., Gendron D., Brosseau J.P., Thibault P., Lucier J.F., Tremblay K., Prinos P., Wellinger R.J., Chabot B., Rancourt C. and Elela S.A. (2008). Identification of alternative splicing markers for breast cancer. *Cancer Res* **68**(22): 9525-31.
- Watanabe T., Huang H., Nakamura M., Wischhusen J., Weller M., Kleihues P., Ohgaki H. (2002). Methylation of the p73 gene in gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* **104**: 357-62
- Watanabe Y. and Nurse P. (1999). Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* **400**(6743): 461-4.

- Weaver B.A. and Cleveland D.W. (2007). Aneuploidy: instigator and inhibitor of tumorigenesis. *Cancer Res* **67**(21): 10103-5.
- Weinstock D.M., Elliott B. and Jasin M. (2006a). A model of oncogenic rearrangements: differences between chromosomal translocation mechanisms and simple double-strand break repair. *Blood* **107**(2): 777-80.
- Weinstock D.M., Richardson C.A., Elliott B. and Jasin M. (2006b). Modeling oncogenic translocations: distinct roles for double-strand break repair pathways in translocation formation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* **5**(9-10): 1065-74.
- Wen P.Y. and Kesari S. (2008). Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* **359**(5): 492-507.
- Winey M. (1999). Cell cycle: driving the centrosome cycle. *Curr Biol* **9**(12): R449-52.
- Wrensch M., Jenkins R.B., Chang J.S., Yeh R.F., Xiao Y., Decker P.A., Ballman K.V., Berger M., Buckner J.C., Chang S., Giannini C., Halder C., Kollmeyer T.M., Kosel M.L., LaChance D.H., McCoy L., O'Neill B.P., Patoka J., Pico A.R., Prados M., Quesenberry C., Rice T., Ryneerson A.L., Smirnov I., Tihan T., Wiemels J., Yang P. and Wiencke J.K. (2009). Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility. *Nat Genet* **41**(8): 905-8.
- Yamada K., Kasama M., Kondo T., Shinoura N. and Yoshioka M. (1994). Chromosome studies in 70 brain tumors with special attention to sex chromosome loss and single autosomal trisomy. *Cancer Genet Cytogenet* **73**(1): 46-52.

- Yamini, B., Yu, X., Dolan, M.E., Wu, M.H., Darga, T.E., Kufe, D.W. & Weichselbaum, R.R. (2007). Inhibition of nuclear factor-kappaB activity by temozolomide involves O6-methylguanine induced inhibition of p65 DNA binding. *Cancer Res* **67**, 6889-98.
- Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., Vogelstein, B. & Bigner, D. D. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* **360**, 765-73.
- Yang P., Kollmeyer T.M., Buckner K., Bamlet W., Ballman K.V., Jenkins R.B. (2005). Polymorphisms in GLTSCR1 and ERCC2 are associated with the development of oligodendrogliomas. *Cancer* **103**(11):2363-72.
- Yang Y., Fruehauf J., Xiang S. and Li C.J. (2006). Genomic instability in precancerous lesions before inactivation of tumor suppressors p53 and APC in patient. *Cell Cycle* **5**(13): 1443-7.
- Zhou X.P., Li Y.J., Hoang-Xuan K., Laurent-Puig P., Mokhtari K., Longy M., Sanson M., Delattre J.Y., Thomas G. and Hamelin R. (1999). Mutational analysis of the PTEN gene in gliomas: molecular and pathological correlations. *Int J Cancer* **84**(2): 150-4.



AVANT-PROPOS

ARTICLE 1

AVANT-PROPOS

EGF receptor inhibitors in the treatment of glioblastoma multiform: old clinical allies and newly emerging therapeutic concepts.

Article publié dans la revue *European journal of Pharmacology* 625(2009) 23-30

Macoura Gadji, Ana-Maria Tsanaclis Crous, David Fortin, Jerry Krcek, Mark Torchia, Sabine Mai, Regen Drouin, Thomas Klonisch

Résumé :

Le glioblastome multiforme (GBM) est la tumeur cérébrale la plus maligne chez l'adulte. En dépit de dizaines d'années de recherche pour améliorer le devenir des patients ayant un GBM, cette tumeur hautement agressive reste fatale. Les GBM primaires sont souvent caractérisés par la surexpression du récepteur du facteur de croissance EGF (epidermal growth factor)/HER1 et/ou ses variants et mutants. Ces tumeurs, de manière indépendante par rapport au ligand, activent constitutionnellement le variant EGF receptor VIII qui est le plus fréquemment observé dans les GBM. La signalisation par le récepteur de EGF peut promouvoir la tumorigenèse en augmentant la prolifération cellulaire, l'invasion du tissu, la néoangiogenèse, la chimiorésistance des cellules tumorales, et par inhibition de l'apoptose des cellules cancéreuses. Le récepteur de EGF a été le premier récepteur à être pris comme cible pour la thérapie anticancéreuse de plusieurs tumeurs solides. Après une vingtaine d'années d'intense thérapie moléculaire ciblant le récepteur de l'EGF, plusieurs inhibiteurs anti-récepteurs de l'EGF sont actuellement disponibles en clinique. Les stratégies thérapeutiques qui ciblent le récepteur EGF et ses formes mutantes dans les GBM incluent les anticorps monoclonaux, les inhibiteurs des tyrosines kinases et les composés ARNi. Cependant, en dépit du fait que la plupart des thérapies dirigées contre le récepteur de l'EGF dans les gliomes sont focalisées à ce jour sur des agents thérapeutiques simples, une approche multi-directionnelle impliquant l'inhibition de multiples voies de signalisation a émergé comme une plus robuste approche thérapeutique. Davantage encore, l'émergence de l'hypothèse de "cellules souches cancéreuses du cerveau" dans le bulbe des GBM, identifie cette

population de cellules avec la capacité de s'auto renouveler comme les nouvelles cibles obligatoires pour une cure efficace des GBM. Ici, nous résumons les trouvailles récentes sur le rôle clinique de ces agents thérapeutiques inhibiteurs des récepteurs de l'EGF dans le traitement des GBM.

Mots clés : EGF receptor, inhibiteurs des tyrosines kinases, glioblastome multiforme, GBM, gliomes, cellules souches cancéreuses

Ma contribution: J'ai conçu et écrit une première version complète de cet article sur l'invitation du Dr Thomas Klonisch d'écrire un article de revue. J'ai écrit aussi les commentaires en réponses aux évaluateurs de la revue. Cet article contient 1 tableau et 2 figures que j'ai conçus.

EGF receptor inhibitors in the treatment of glioblastoma multiform: old clinical allies and newly emerging therapeutic concepts.

Macoura Gadji^a Ana-Maria Tsanaclis Crous^b, David Fortin^c, Jerry Krcek^{d,g}, Mark Torchia^{e,g}, Sabine Mai^{f,g}, Regen Drouin^a, Thomas Klonisch^{g,h,*}

^a Department of Pediatrics, Division of Genetics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 5N4

^b Department of Pathology, Division of Neurosurgery, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 5N4

^c Department of Surgery, Division of Neurosurgery, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 5N4

^d Department of Neurosurgery, University of Manitoba, Canada

^e Department of Surgery, University of Manitoba, Canada

^f Manitoba Institute of Cell Biology, CancerCare Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada R3E 0V9

^g Department of Human Anatomy and Cell Science, University of Manitoba, Canada

^h Department of Medical Microbiology & Infectious Diseases, University of Manitoba, Canada

Key words: EGF receptor, tyrosine kinase inhibitor, glioblastoma multiform, GBM, glioma, cancer stem cells

Abstract

Glioblastoma multiform (GBM) is the most common malignant brain tumour in adults. Despite decades of experimentation to improve the outcome of patients with GBM this highly aggressive tumour remains fatal. Primary GBM are often characterized by the over-expression of epidermal growth factor receptor EGF receptor/HER1 and/or its mutational variants, with ligand-independent, constitutively active EGF receptor VIII variant most frequently observed in GBM. EGF receptor signalling can promote tumorigenesis by increasing cell proliferation, tissue invasion, neoangiogenesis, tumour cell chemoresistance, and by inhibiting apoptosis of cancer cells. EGF receptor was the first receptor to serve as target for

cancer therapy of many solid tumours. After 2 decades of intensive targeting of EGF receptor for molecular therapy, several anti-EGF receptor inhibitors are now available in the clinic. Therapeutic strategies to target EGF receptor and EGF receptor mutant forms in GBM include humanized monoclonal antibodies, tyrosine kinase inhibitors, and RNAi compounds.

However, despite the fact that most EGF receptor-directed glioma therapies to date have focused on single therapeutic agents, a multi-directional approach involving targeted inhibition of multiple signalling pathways has emerged as a more robust therapeutical approach. Furthermore, the emergence of the hypothesis of « brain cancer stem cells» in the bulb of GBM identifies this population of cells with self-renewal capacity as novel obligatory targets for efficient cure of GBM. Here we summarize current findings on the clinical role of these EGF receptor inhibitory therapeutic agents in the treatment of GBM.

1- Introduction

The last decade of cancer research has brought up the concept of «targeted molecular therapy» based on a growing knowledge of the molecular and genetic basis of specific cancer types. This was exemplified by the successful targeting of mutant kinases in haematological malignancies and in solid tumours. The classical example is the clinical success of the low molecular weight tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate (Gleevec) in chronic myeloid leukaemia (CML) (Druker et al., 2001; Gorre et al., 2001) and in the gastrointestinal stromal tumours (GIST) (Weil, 2008). In CML patients, Imatinib effectively blocks Bcr-Abl kinase activity of the mutant kinase fusion protein Bcr-Abl which is a driving force in CML. Similarly,

imatinib blocks the activity of the point-mutated c-Kit or platelet derived growth factor receptor (PDGFR)-alpha kinase which is involved in gastrointestinal stromal tumorigenesis (Sawyers, 2004). The family of membrane-anchored epidermal growth factor receptor tyrosine kinases, and here EGF receptor/HER1 and its various mutant forms in particular, are important pathogenic components in multiple cancer types, including gliomas. EGF receptor signalling promotes proliferation, tissue invasion, increases chemoresistance and inhibits apoptosis of glioma cells (Dancey and Freidlin, 2003). This review addresses the role of tyrosine kinase inhibitors and other therapeutic agents in the current EGF receptor-targeted therapeutic strategies for patients with high-grade gliomas and provides an outlook on novel concepts in the treatment of glioblastoma multiform (GBM).

2- Pathology of GBM

Human gliomas account for ca. 35% of all brain tumors and are comprised of astrocytomas, oligodendrogliomas and oligoastrocytomas (Friedman et al., 2000; Murat et al., 2008). Modern classification of astrocytic tumours of the diffuse type distinguishes between WHO grade II astrocytoma of the diffuse type, grade III anaplastic astrocytoma, and grade IV glioblastoma or GBM. The highly malignant and rapidly growing anaplastic astrocytoma and GBM constitute about 50-60% of primary brain tumours with an incidence ranging from 5 to 8 per 100,000 of population (Friedman et al., 2000). GBM constitutes 55% of all primary gliomas (Collins, 1998; Gurney and Kadan-Lottick, 2001) and histological hallmarks of GBM are high cellularity, anaplasia, neovascularization, and necrosis. Despite decades of experimentation to improve the outcome of patients afflicted by this

cancer, GBM remains fatal with a median survival of about 12 to 15 months. This is one of the worst 5-year survival rates among all human cancers (Krex et al., 2007; Ohgaki et al., 2004; Smith and Jenkins, 2000). Standard treatment of GBM typically consists of a gross total resection of the lesion to the extent that is safely feasible, followed by radiotherapy and/ or chemotherapy (Hegi et al., 2005; Krex et al., 2007). Interestingly, subgroups of GBM patients survive for more than 36 months, highlighting the biological heterogeneity of this disease (Krex et al., 2007). Based on clinical and genetic parameters, GBM are classified into primary and secondary GBM. Primary GBM originate *de novo* and account for up to 95% of all GBM. Secondary GBM slowly evolves from pre-existing low-grade diffuse astrocytoma and upon anaplastic changes reaches the GBM stage after several years (Dropcho and Soong, 1996; Furnari et al., 2007; Murat et al., 2008; Ohgaki and Kleihues, 2007). Primary GBM are characterized by EGF receptor amplification and mutations, loss of heterozygosity of 10q, deletion of the phosphatase and tensin homologue on chromosome 10 (PTEN 10), and p16 deletion (Murat et al., 2008). Secondary GBM is associated with mutations in the p53 tumour suppressor gene, over-expression of the platelet-derived growth factor receptor (PDGF receptor), loss of heterozygosity of 10q, and anomalies in the p16 and retinoblastoma (Rb) pathways. Secondary GBMs have transcriptional patterns and aberrations in the DNA copy number that differ markedly from those of primary GBMs (Furnari et al., 2007; Murat et al., 2008; Ohgaki and Kleihues, 2007). About 30% of glioblastoma show molecular alterations that neither correspond to primary nor secondary GBM pathways previously referred too (Collins, 1998; Holland, 2001; Kleihues and Ohgaki, 1999; Martinez et al., 2004; von Deimling et al., 1995; von Deimling et al.,

1993). These include gliomas with a gene-inactivating methylation for O(6)-Methylguanine Methyltransferase (MGMT) which may be more responsive to chemotherapy (Buckner and Moynihan, 2001; Hegi et al., 2005). In spite of all molecular and genetic differences, GBMs share an indistinguishable morphology and low success rate in response to conventional therapies, thus, limiting the ability of histopathology in providing a firm prognosis for patient survival.

3- EGF receptor and mutant forms in GBM

The human ErbB family members, ErbB/HER 1 to 4, are membrane-anchored receptor tyrosine kinases (RTK) with critical roles during normal development, differentiation, growth, and cell survival (Massague and Pandiella, 1993). Structurally, ErbB/HER receptors are composed of a glycosylated extracellular ligand-binding ectodomain, a single transmembrane spanning region, and a cytoplasmic domain with a tyrosine kinase domain essential for intracellular signalling (Garrett et al., 2002; Ward et al., 2007; Weihua et al., 2008). Upon interaction with specific EGF-like ligands, ErbB/HER homo- or heterodimerize which results in the activation of multiple intracellular signalling pathways in a cell- and tissue-specific manner (Jura et al., 2009; Nicholas et al., 2006) (Fig. 1).

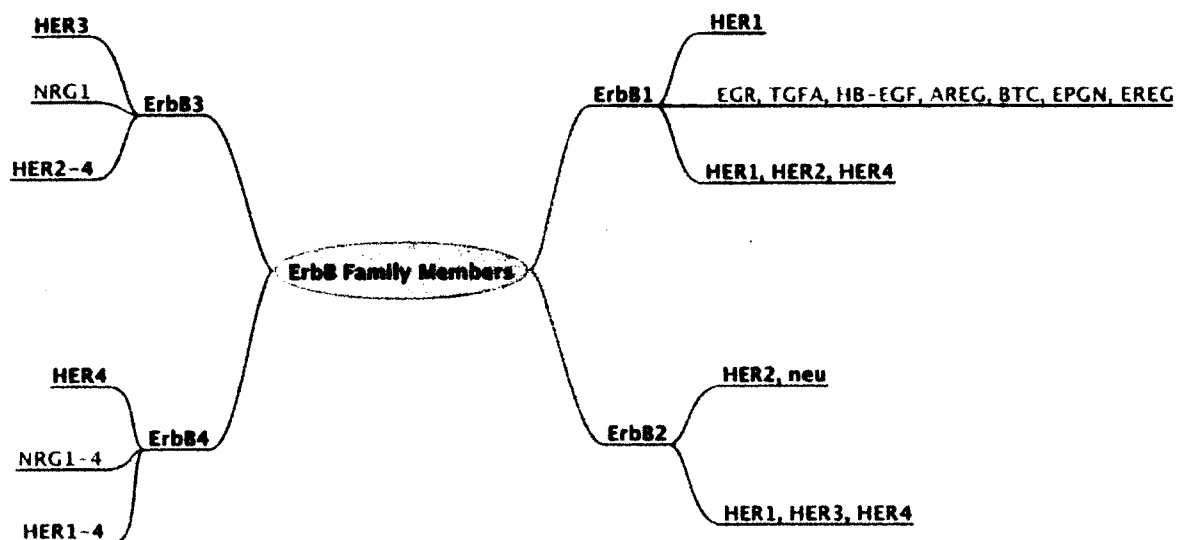


Fig. 1. EGF receptor family members with some of their preferred ligands, including epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor alpha (TGFA), heparin-binding EGF (HB-EGF), amphiregulin (AREG), epigen (EPGN), betacellulin (BTC), epiregulin (EREG), and neurogulins (NRGs).

The EGF receptor (HER1; ErbB1) plays a critical role in the biology of GBMs. EGF receptor is over-expressed in up to 50% of primary GBM as compared to only 10% in anaplastic astrocytoma and EGF receptor expression levels correlate with glioma grade, decreased apoptosis, radioresistance, and unfavourable prognosis and overall survival in GBM patients (Barker et al., 2001; Chakravarti et al., 2002; Halatsch et al., 2003; Salomon et al., 1995; Shinjima et al., 2003). In GBMs, common deletion mutations typically target the extracellular EGF receptor domain and are composed of EGF receptor vI, EGF receptor vII (12-16%), EGF receptor vIII (55-62%), EGF receptor vIV and EGF receptor vV (11-17%) (Belda-Iniesta et al., 2008; Libermann et al., 1985; Nicholas et al., 2006) (Fig. 2).

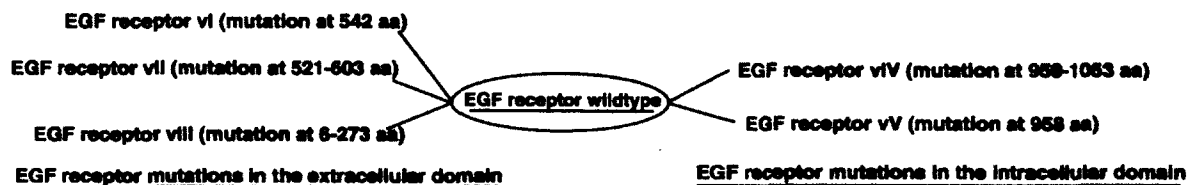


Fig. 2. EGF receptor wildtype and its variant mutants in GBM.

EGF receptor vii has a deletion of exons 14 and 15 resulting in a truncated extracellular domain. EGF receptor vi and EGF receptor v mutant variants are the result of NH₂-terminal and COOH-terminal truncations, respectively. EGF receptor vii and EGF receptor viii mutant variants consist of a variety of tandem duplications of exons and missense or insertion mutations (Nicholas et al., 2006). EGF receptor viii, also named del2-7 EGF receptor, is the most frequently observed constitutively active and endocytosis-impaired EGF receptor mutant in GBM and refers to an EGF receptor transcript with a deletion of exons 2-7, corresponding to the cDNA nucleotides 275-1075 encoding amino acids 6-273 of the extracellular domain (Shinojima et al., 2003). This EGF receptor viii mutation may occur as a result of multiple Alu repeats in introns 1-7 potentially contributing to alternative splicing or gene rearrangements (Ekstrand et al., 1992; Frederick et al., 2000; Wong et al., 1992; Yamazaki et al., 1990). The increased oncogenic potential of this constitutively active EGF receptor viii deletion mutant (Nagane et al., 1996; Nishikawa et al., 1994) likely depends on the enhanced downstream signalling of activated phosphatidylinositol 3' kinase (PI3K)-PKB/AKT and MAPK/ERK 1/2 pathways (Choe et al., 2003; Klingler-Hoffmann et al., 2003; Moscatello et al., 1995; Prigent et al., 1996). Blocking this enhanced signal transduction cascade has

been recognized as a promising therapeutic strategy to reverse cell proliferation and radio-/chemoresistance and increase apoptosis in GBM.

4- EGF receptor targeted treatment in GBMs

The high incidence of over-expression of wildtype EGF receptor and the presence of activated EGF receptor mutant forms like EGF receptor VIII in GBM identify this RTK as a suitable target for molecular therapies. Among numerous inhibitors of EGF receptor in development, some have now been approved and are tested for clinical use (Table 1)

Table 1. Examples of treatment regimes involving EGF receptor inhibitors in malignant glioma.

| | | | | | |
|---------------------------------|--------------|--|--------------------------|---------------|---|
| | | | | | |
| Mab-425 | EGF-receptor | Inhibition of EGF-receptor | Phase II/ NCT00589706 | Ongoing trial | A phase II study of adjuvant use of anti-EGF receptor EGFR-425 in high grade gliomas |
| Gefitinib (ZD1839; Iressa) | EGF receptor | ATP mimetic agent, blocks EGFR phosphorylation | NCT00250887 | Ongoing trial | Pre- and postoperative use of gefitinib in recurrent glioblastoma, including translational research |
| Erlotinib (OSI-774; Tarceva) | EGF receptor | ATP mimetic agent, blocks EGFR phosphorylation | NCT00337883 | Ongoing trial | A study on the safety and efficacy of erlotinib in patients with first relapse of Grade IV glioma (glioblastoma multiforme) |
| Erlotinib | EGF receptor | ATP mimetic agent, blocks EGFR phosphorylation | NCT00360854 | Ongoing trial | Erlotinib alone or in combination with radiation therapy in treating young patients with refractory or relapsed malignant brain tumors or Newly diagnosed brain stem glioma |

| | | | | | |
|----------------------------------|---|--|--------------------------|--|--|
| Erlotinib | EGF receptor | ATP mimetic agent, blocks EGF receptor phosphorylation | NCT00301418 | Ongoing trial | Oral erlotinib study for recurrent/residual glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma |
| Erlotinib | EGF receptor | ATP mimetic agent, blocks EGF receptor phosphorylation | NCT00387894 | Ongoing trial | Erlotinib in treating patients with recurrent glioblastoma multiforme or gliosarcoma |
| Erlotinib | EGF receptor | ATP mimetic agent, blocks EGF receptor phosphorylation | NCT00054496 | Ongoing trial | Erlotinib in treating patients with recurrent or progressive glioblastoma multiforme |
| Erlotinib & gefitinib | EGF receptor and EGF receptor VIII | ATP mimetic agent, blocks EGFR phosphorylation | Several clinical trials | no objective responses to Gefitinib encouraging responses to Erlotinib | (Preusser et al., 2008) |
| Bevacizumab & Erlotinib | VEGF and Isoforms EGF receptor | Anti-angiogenesis, ATP mimetic agent, blocks EGF receptor phosphorylation | Phase II/ NCT00671970 | Ongoing trial | Phase II bevacizumab + erlotinib for patients with recurrent malignant glioma (MG) |
| Cetuximab-bevacizumab-irinotecan | EGF receptor VEGF (plus isoforms) DNA and Chromatin | Humanised murine Ab, Blocks EGF receptor activation, Anti-angiogenesis Topoisomerase inhibitor | NCT00463073 | Ongoing trial | Cetuximab, bevacizumab and irinotecan for patients with malignant glioblastoma |

| | | | | | |
|---|---------------------------------------|--|-------------|--|---|
| BIBW-2992 | EGF receptor and ErbB2/Her2 | Kinase inhibitor Inhibition of both ErbB1 and ErbB2 | Phase I/II | Trial in progress | (Minkovsky and Berezov, 2008) |
| AEE788 | EGF receptor, ErbB2 and VEGF2 | Inhibits phosphorylation of all these 3 targets | NCT00116376 | Ongoing trial | Study of AEE788 in patients with recurrent/relapse glioblastoma multiforme |
| Erlotinib and/or Temozolomide | EGF receptor and tumor cells | ATP mimetic agent, blocks EGFR phosphorylation, alkylating agent. | Phase I | 19.5% response | (Haas-Kogan et al., 2005) |
| Erlotinib and temozolomide and radiotherapy | EGF receptor and tumor cells | ATP mimetic agent, blocks EGFR phosphorylation, Alkylating agent, DNA damage | Phase I/II | No signs of benefit | (Brown et al., 2008) |
| Erlotinib and carboplastin | EGF receptor and DNA alkylating agent | ATP mimetic agent, blocks EGFR phosphorylation | Phase II | One partial response; 47% stable disease | (de Groot et al., 2008) |
| Gefitinib and Radiotherapy | EGF receptor Tumour cells | ATP mimetic agent, blocks EGF receptor phosphorylation, DNA damage | NCT00052208 | Ongoing trial | Gefitinib and radiation therapy in treating patients with glioblastoma multiforme |

| | | | | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|--|-------------|--|--|
| Gefitinib and everolimus | EGF receptor and mTor | ATP mimetic agent, blocks EGFR phosphorylation, inhibition of mTOR | Pilot study | 36% stable disease; 14% partial response | (Kreisl et al., 2009) |
| Gefitinib or erlotinib and sirolimus | EGF receptor, EGFRvIII, and mTor | ATP mimetic agent, blocks EGFR phosphorylation, inhibition of mTOR | Pilot study | 19% partial response; 50% stable disease | (Doherty et al., 2006) |
| Erlotinib and sirolimus | EGF receptor mTOR | ATP mimetic agent, blocks EGFR phosphorylation, inhibition of mTOR | NCT00509431 | Ongoing trial | Erlotinib and sirolimus in treating patients with recurrent malignant glioma |
| Erlotinib and sirolimus | EGF receptor mTOR | ATP mimetic agent, blocks EGF receptor phosphorylation, inhibition of mTOR | NCT00672243 | Ongoing trial | Ph II erlotinib + sirolimus for Pts w recurrent malignant glioblastoma multiforme |
| Everolimus and gefitinib | mTOR EGF receptor | Inhibition of mTOR ATP mimetic agent, blocks EGF receptor phosphorylation | NCT00085566 | Ongoing trial | Everolimus and Gefitinib in treatment of patients with progressive glioblastoma multiforme or progressive metastatic prostate cancer |
| Everolimus (RAD001 | mTOR | Inhibition of mTOR | NCT00515086 | Ongoing trial | Study of everolimus in patients with recurrent glioblastoma multiforme |

Several EGF receptor-targeted strategies are aimed at (i) blocking ligand binding, (ii) reducing tyrosine kinase activity, and (iii) interfering with key regulatory elements of downstream signal transduction pathways. Numerous approaches are used to achieve this. (Neyns et al., 2009). Other mAbs include nimotuzumab (TheraCIM-hR3) (Casaco et al., 2008; Talavera et al., 2009; Torres et al., 2005), matuzumab (EMD 72000) (Meira et al., 2009; Schittenhelm et al., 2009; Schmiedel et al., 2008), zalutumumab (Lammerts van Bueren et al., 2008; Rivera et al., 2009), the fully human monoclonal IgG2 antibody against EGF receptor, panitumumab (ABX-EGF) (Cohenuram and Saif, 2007; Freeman et al., 2009; Peeters et al., 2008) and the mAb L8A4 against EGF receptor vIII (Yang et al., 2009; Yang et al., 2008). Several of these mAbs against EGF receptor are in clinical trials and recommended for combined treatment with either another mAb, as is the case with L8A4 and cetuximab (Yang et al., 2009), or with a group of small EGF receptor tyrosine kinase inhibitor molecules to block tyrosine kinase activation and signalling by the EGF receptor (Table 1).

Orally administered, low molecular weight EGF receptor tyrosine kinase inhibitor compounds act as ATP mimetic agents, bind to the cytoplasmic ATP pocket domain, and block EGF receptor phosphorylation and activation of downstream pathways (Arteaga, 2003). Most advanced in clinical development are erlotinib (OSI-774, CP-358,774, Tarceva) and gefitinib (ZD1839, Iressa) which have been used in malignant glioma (Mendelsohn and Baselga, 2006; Raizer, 2005) (Table 1). Gefitinib is a anilinoquinazoline that reversibly inhibits EGF receptor tyrosine kinase auto-phosphorylation and downstream signalling (Albanell et al., 2001; Anido et al., 2003; Baselga, 2001). Employed at higher doses, gefitinib can also

inhibit EGF receptor vIII mutant but at low doses seems to confer a growth advantage in the presence of EGF receptor vIII (Nicholas et al., 2006; Pedersen et al., 2005). Most positive clinical responses to gefitinib are observed in tumours like non-small cell lung cancer (NSCLC) with mutations in exons 18–21 of the EGF receptor gene (Franco-Hernandez et al., 2007; Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004). These EGF receptor mutations are not detected in glioma, which may in part explain the resistance of GBM to gefitinib (Marie et al., 2005). The quinazolinamine erlotinib is a reversible inhibitor of EGF receptor and EGF receptor vIII tyrosine kinase activity (Moyer et al., 1997; Pollack et al., 1999) and has been tested in Phase I and pharmacokinetic studies in high-grade gliomas (Broniscer et al., 2009; Prados et al., 2006). Erlotinib inhibits EGF receptor-mediated proliferation and anchorage-independent growth of GBM cell lines and secondary GBM are more sensitive to erlotinib and respond with increased apoptosis (Halatsch et al., 2004). When exposed to erlotinib or tyrphostin AG1478, another specific inhibitor of EGF receptor vIII and EGF receptor in glioma cells (Bigner et al., 1990; Levitzki and Gazit, 1995), EGF receptor vIII-transformed human GBM cell lines were shown to down-regulate the EGF receptor vIII-mediated activation of genes implicated in tissue invasion (Lal et al., 2002). Currently, erlotinib is enrolled in a number of clinical trials targeted at high-grade gliomas, either as a solitary compound or in combination with (i) bevacizumab, a humanized mAb against vascular endothelial growth factor (VEGF) or (ii) sirolimus/ everolimus, compounds inhibiting TOR signaling (Narayana et al., 2009; Reardon et al., 2009). (Table 1). Other tyrosine kinase inhibitors currently employed for GBMs are the pan-HER-Tyrosine kinase inhibitor CI-1033 (Moyer et al., 1997), HKI-272 (Rabindran et al., 2004;

Schittenhelm et al., 2009), the dual EGF receptor/HER1 and ErbB2/HER2 inhibitor BIBW-2992 (Eskens et al., 2008; Minkovsky and Berezov, 2008), lapatinib (Broniscer et al., 2009; Gril et al., 2008), and tyrophostin AG1478 (Chakravarti et al., 2002).

Compounds simultaneously targeting inhibition of both the EGF receptor/HER1 and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) include ZD6474 (vandetanib) (Ciardiello et al., 2003; Sandstrom et al., 2008) and AEE788 (Traxler et al., 2004) which are employed in the treatment of GBMs. AEE788 shows enhanced efficacy in combination with the rapamycin (mTOR) inhibitor RAD001 (Goudar et al., 2005). This may in part be explained by the finding of a loss-of-function mutation in glioma of the tumour suppressor and physiological negative regulator of the PI3K/AKT signaling pathway, phosphatase/tensin homologue on chromosome 10 (PTEN), resulting in constitutively active AKT-TOR pathway activation and providing the rationale for a currently conducted clinical trial of AEE788 with RAD001 (Goudar et al., 2005) (Table 1).

Alternative EGF receptor targeting strategies in high-grade glioma patients include the use of radio-labelled mAbs against EGF receptor/HER1 and EGFRvIII (Quang and Brady, 2004; Takasu et al., 2003). Another therapeutic approach for GBMs has been the use of recombinant chimeric EGF receptor ligand transforming growth factor alpha (TGF- α) fused to mutated pseudomonas exotoxin (TP-38) or a fusion of EGF with domains of diphtheria toxin (DAB389EGF) (Cohen et al., 2003; Sampson et al., 2003). Since the initial report on the administration of antisense RNA for EGF receptor/HER1 in GBM patients (Zhang et al., 2004; Zhang et al., 2002), virus-based new RNA interference (RNAi) technology for EGF

receptor/HER1 has been successfully employed in a murine model of intracranial tumor (Zhang et al., 2003; Zhang et al., 2004). Finally, EGF receptor vIII-targeted small catalytically active RNA molecules, named ribozymes, were shown to reduce the proliferation of human GBM cell lines (Halatsch et al., 2000; Yamazaki et al., 1998).

5- Combinatorial therapies and new therapeutic concepts for GBM

Most EGF receptor-directed glioma therapies to date have focused on single therapeutic agents but results remain modest since gliomas quickly develop resistance to chemotherapeutic strategies targeting a specific pathway. A multi-directional approach involving targeted inhibition of multiple signalling pathways may be more effective than inhibition of a single target (Karpel-Massler et al., 2009; Tabernero, 2007). The frequent deletion of the phosphatase and tensin homolog (PTEN 10) gene in GBM results in the constitutive activation of downstream Akt signalling. This is reflected clinically in the observation that GBM patients with co-expression of PTEN and EGF receptor vIII are responsive to erlotinib. However, in GBM with PTEN deleted the EGF receptor-targeted inhibition by tyrosine kinase inhibitor has no therapeutic effect and, thus, monotherapy with tyrosine kinase inhibitor is contra-indicated but would necessitate treatment with rapamycin (mTOR) inhibitor RAD001 (Garrett et al., 2002; Goudar et al., 2005; Mellinghoff et al., 2005). Combined targeting of VEGF and EGF receptor signalling pathways is intended to compromise both tumour angiogenesis and tumour cell growth. These RTK pathways are related and VEGF over-expression promotes EGF receptor resistance. However, EGF receptor inhibition does not substantially inhibit

angiogenesis and an anti-VEGF agent such as AEE788 or bevacizumab is required to inhibit angiogenesis in GBM (Table 1). Glioblastoma cell lines resistant to the tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG1478 were shown to over-express insulin-like growth factor receptor I (IGFRI) and co-inhibition of EGF receptor and IGFRI resulted in enhanced chemosensitivity and apoptosis in these glioma cells (Chakravarti et al., 2002).

6- Cancer stem cells (CSC) in glioblastoma and therapeutic challenges

Traditional anticancer therapy has focused on removing the bulk of tumour tissue but has ignored the small population of self-replicating CSC. Effective cancer therapy should not only address the matured cancer cell compartment which makes up the majority of the cancer but has to also effectively target cancer stem/progenitor cells to (ideally) completely eradicate the tumour and prevent the evolution of more aggressive tumour phenotypes. This is particularly true for higher-grade gliomas, which are often not removed by surgery alone to avoid extensive damage to surrounding healthy brain tissue. Recurrences of even more aggressive GBM forms are frequent and determine the fate of the patient (Weihua et al., 2008; Zeppernick et al., 2008). The notorious therapeutic resistance of GBM has been attributed to DNA-repair proficiency, a multitude of deregulated molecular pathways, and, more recently, to the particular biology of brain cancer stem/progenitor cells (Frosina, 2009; Murat et al., 2008; Ropolo et al., 2009). The CSC hypothesis proposed over 40 years ago for hematological malignancies (Bruce and Van Der Gaag, 1963; Wicha et al., 2006) stipulates that a tumour is composed of a functional cell hierarchy in which CSCs are at the core of this hierarchy

initiating tumour formation and giving rise to heterogeneous cell types (Dirks, 2008; Sulman et al., 2008). CSCs constitute a small population of cells embedded within a supporting cell niche within a tumour with the ability to self-replicate (Klonisch et al., 2008) and maintain or expand the stem cell pool, the ability to initiate and maintain the tumour, and the capacity to differentiate into heterogeneous populations of cells that make up the bulk of the tumour and constitute of cells that retain more limited capacity for proliferation and differentiation (progenitors or transit-amplifying cells), lineage-committed progenitors, or terminally differentiated tumour cells (Clarke et al., 2006; Dirks, 2008; Singh et al., 2004; Clarke et al., 2006). Brain CSCs express the five transmembrane marker CD133 (prominin-1), a hematopoietic precursor marker, which can be used to isolate these cells. CD133+ brain CSC can evade radio- and chemotherapy because of their superior DNA damage repair capabilities and/or over-expression of transmembrane ABC transporter family members which facilitate the efflux of certain anticancer drugs. Thus, CD133+ brain CSC may be considered multi-resistant to anticancer therapies (Liu et al., 2006). Brain CSCs can be enriched *in vitro* and *in vivo* in xenograft tumours when exposed to ionizing radiation (Bao et al., 2006). These CD133+ brain CSCs show increased activation of DNA damage checkpoint mechanisms and more efficient DNA repair after radiation (Bao et al., 2006). Induce neural stem cells to differentiate into mature astrocytes, soluble bone morphogenetic proteins (BMPs), can prompt depletion of the pool of CSC in brain tumours by causing the differentiation of brain CSCs, thus, weakening the brain CSCs' tumorigenicity both *in vitro* and *in vivo* when engrafted into mice (Clarke et al., 2006; Piccirillo and Vescovi, 2006). CD133+ brain CSCs often express higher levels of the breast

cancer resistance protein (BCRP/ABCG2), a member of the ABC family of drug transporters, the DNA repair enzyme *O*⁶-methylguanine-DNA methyl transferase (MGMT) (Hegi et al., 2005), and anti-apoptotic gene products (Wicha et al., 2006). All of these factors may contribute to the increased and multiple chemoresistance of brain CSC, including the imidazotetrazine derivative and alkylating agent temozolomide (Temodal) used to treat aggressive brain cancers (Sulman et al., 2008) (Hegi et al., 2005). However, temozolomide has recently been shown to induce a dose- and time-dependent decline of the brain CSC subpopulation (Beier et al., 2008). Further benefit of a multi-directional drug approach for the treatment of brain cancer derives from the observation that brain CSCs play a role in promoting angiogenesis and this action is blocked with the anti-VEGF antibody bevacizumab (Bao et al., 2006).

The cancer stem/progenitor cell populations and the matured cancer cell compartment create a dynamic and intricate network of interdependency and the extensive phenotypic plasticity present within these tumour cell populations suggests a dynamic equilibrium between CSCs and non-CSCs within tumours (Gupta et al., 2009; Shackleton et al., 2009). Novel therapeutic approaches that combine existing treatment options as described for EGF receptor targeted approaches above with novel technologies aimed at seeking and destroying the CSC compartment of GBM and/or destabilizing specific CSC supportive tumour niches may provide a long-awaited and more effective therapy for GBM patients.

Acknowledgements

MG was supported by a short-term fellowship through the CIHR Strategic Training Program “Innovative Technologies in Multidisciplinary Health Research Training”. TK is grateful for financial support through the Health Science Centre Foundation (HSCF), the Manitoba Health Research Council (MHRC), and the Natural Sciences and Bioengineering Council of Canada (NSERC). RD holds the Canadian Research Chair in Genetics, Mutagenesis and Cancer at Université de Sherbrooke. DF holds the National Bank of Canada Chair in « brain tumor treatment».

References

- Albanell, J., Rojo, F., Baselga, J., 2001. Pharmacodynamic studies with the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839. *Semin Oncol* 28, 56-66.
- Anido, J., Matar, P., Albanell, J., Guzman, M., Rojo, F., Arribas, J., Averbuch, S., Baselga, J., 2003. ZD1839, a specific epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, induces the formation of inactive EGFR/HER2 and EGFR/HER3 heterodimers and prevents heregulin signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 9, 1274-1283.
- Arteaga, C., 2003. Targeting HER1/EGFR: a molecular approach to cancer therapy. *Semin Oncol* 30, 3-14.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., Rich, J.N., 2006. Glioma stem cells promote

radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756-760.

Barker, F.G., 2nd, Simmons, M.L., Chang, S.M., Prados, M.D., Larson, D.A., Sneed, P.K., Wara, W.M., Berger, M.S., Chen, P., Israel, M.A., Aldape, K.D., 2001. EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51, 410-418.

Beier, D., Rohrl, S., Pillai, D.R., Schwarz, S., Kunz-Schughart, L.A., Leukel, P., Proescholdt, M., Brawanski, A., Bogdahn, U., Trampe-Kieslich, A., Giebel, B., Wischhusen, J., Reifenberger, G., Hau, P., Beier, C.P., 2008. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res* 68, 5706-5715.

Belda-Iniesta, C., de Castro Carpeno, J., Sereno, M., Gonzalez-Baron, M., Perona, R., 2008. Epidermal growth factor receptor and glioblastoma multiforme: molecular basis for a new approach. *Clin Transl Oncol* 10, 73-77.

Bigner, S.H., Humphrey, P.A., Wong, A.J., Vogelstein, B., Mark, J., Friedman, H.S., Bigner, D.D., 1990. Characterization of the epidermal growth factor receptor in human glioma cell lines and xenografts. *Cancer Res* 50, 8017-8022.

Broniscer, A., Baker, S.J., Stewart, C.F., Merchant, T.E., Laningham, F.H., Schaiquevich, P., Kocak, M., Morris, E.B., Endersby, R., Ellison, D.W., Gajjar, A., 2009. Phase I and pharmacokinetic studies of erlotinib administered concurrently with radiotherapy for children, adolescents, and young adults with high-grade glioma. *Clin Cancer Res* 15, 701-707.

- Brown, P.D., Krishnan, S., Sarkaria, J.N., Wu, W., Jaeckle, K.A., Uhm, J.H., Geoffroy, F.J., Arusell, R., Kitange, G., Jenkins, R.B., Kugler, J.W., Morton, R.F., Rowland Jr., K.M., Mischel, P., Yong, W.H., Scheithauer, B.W., Schiff, D., Giannini, C., Buckner, J.C., 2008. Phase I/II trial of erlotinib and temozolomide with radiation therapy in the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group Study N0177. *J. Clin. Oncol.* 26, 5603–5609.
- Bruce, W.R., Van Der Gaag, H., 1963. A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo. *Nature* 199, 79-80.
- Buckner, J.C., Moynihan, T.J., 2001. The DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 344, 686; author reply 687-688.
- Casaco, A., Lopez, G., Garcia, I., Rodriguez, J.A., Fernandez, R., Figueredo, J., Torres, L., Perera, A., Batista, J., Leyva, R., Pena, Y., Amador, Z., Gonzalez, A., Estupinan, B., Coca, M., Hernandez, A., Puig, M., Iglesias, M., Ramos, M., Rodriguez, L., Suarez, N., 2008. Phase I single-dose study of intracavitary-administered Nimotuzumab labeled with 188 Re in adult recurrent high-grade glioma. *Cancer Biol Ther* 7, 333-339.
- Chakravarti, A., Chakladar, A., Delaney, M.A., Latham, D.E., Loeffler, J.S., 2002. The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary

- human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner. *Cancer Res* 62, 4307-4315.
- Choe, G., Horvath, S., Cloughesy, T.F., Crosby, K., Seligson, D., Palotie, A., Inge, L., Smith, B.L., Sawyers, C.L., Mischel, P.S., 2003. Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo. *Cancer Res* 63, 2742-2746.
- Ciardiello, F., Caputo, R., Damiano, V., Troiani, T., Vitagliano, D., Carlomagno, F., Veneziani, B.M., Fontanini, G., Bianco, A.R., Tortora, G., 2003. Antitumor effects of ZD6474, a small molecule vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with additional activity against epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Clin Cancer Res* 9, 1546-1556.
- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., Wahl, G.M., 2006. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66, 9339-9344.
- Cohen, K.A., Liu, T., Bissonette, R., Puri, R.K., Frankel, A.E., 2003. DAB389EGF fusion protein therapy of refractory glioblastoma multiforme. *Curr Pharm Biotechnol* 4, 39-49.
- Cohenuram, M., Saif, M.W., 2007. Panitumumab the first fully human monoclonal antibody: from the bench to the clinic. *Anticancer Drugs* 18, 7-15.
- Collins, V.P., 1998. Gliomas. *Cancer Surv* 32, 37-51.
- Dancey, J.E., Freidlin, B., 2003. Targeting epidermal growth factor receptor--are we missing the mark? *Lancet* 362, 62-64.

- de Groot, J.F., Gilbert, M.R., Aldape, K., Hess, K.R., Hanna, T.A., Ictech, S., Groves, M.D., Conrad, C., Colman, H., Puduvalli, V.K., Levin, V., Yung, W.K., 2008. Phase II study of carboplatin and erlotinib (Tarceva, OSI-774) in patients with recurrent glioblastoma. *J. Neurooncol.* 90, 89–97.
- Dirks, P.B., 2008. Brain tumor stem cells: bringing order to the chaos of brain cancer. *J Clin Oncol* 26, 2916-2924.
- Doherty, L., Gigas, D.C., Kesari, S., Drappatz, J., Kim, R., Zimmerman, J., Ostrowsky, L., Wen, P.Y., 2006. Pilot study of the combination of EGFR and mTOR inhibitors in recurrent malignant gliomas. *Neurology* 67, 156–158.
- Dropcho, E.J., Soong, S.J., 1996. The prognostic impact of prior low grade histology in patients with anaplastic gliomas: a case-control study. *Neurology* 47, 684-690.
- Druker, B.J., Sawyers, C.L., Kantarjian, H., Resta, D.J., Reese, S.F., Ford, J.M., Capdeville, R., Talpaz, M., 2001. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 344, 1038-1042.
- Ekstrand, A.J., Sugawa, N., James, C.D., Collins, V.P., 1992. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4309-4313.

- Eskens, F.A., Mom, C.H., Planting, A.S., Gietema, J.A., Amelsberg, A., Huisman, H., van Doorn, L., Burger, H., Stopfer, P., Verweij, J., de Vries, E.G., 2008. A phase I dose escalation study of BIBW 2992, an irreversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor 1 (EGFR) and 2 (HER2) tyrosine kinase in a 2-week on, 2-week off schedule in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* 98, 80-85.
- Franco-Hernandez, C., Martinez-Glez, V., Arjona, D., de Campos, J.M., Isla, A., Gutierrez, M., Vaquero, J., Rey, J.A., 2007. EGFR sequence variations and real-time quantitative polymerase chain reaction analysis of gene dosage in brain metastases of solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 173, 63-67.
- Frederick, L., Wang, X.Y., Eley, G., James, C.D., 2000. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* 60, 1383-1387.
- Freeman, D.J., Bush, T., Ogbagabriel, S., Belmontes, B., Juan, T., Plewa, C., Van, G., Johnson, C., Radinsky, R., 2009. Activity of panitumumab alone or with chemotherapy in non-small cell lung carcinoma cell lines expressing mutant epidermal growth factor receptor. *Mol Cancer Ther* 8, 1536-1546.
- Friedman, H.S., Kerby, T., Calvert, H., 2000. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res* 6, 2585-2597.
- Frosina, G., 2009. DNA repair and resistance of gliomas to chemotherapy and radiotherapy. *Mol Cancer Res* 7, 989-999.

- Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A., Hahn, W.C., Ligon, K.L., Louis, D.N., Brennan, C., Chin, L., DePinho, R.A., Cavenee, W.K., 2007. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21, 2683-2710.
- Garrett, T.P., McKern, N.M., Lou, M., Elleman, T.C., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Zhu, H.J., Walker, F., Frenkel, M.J., Hoyne, P.A., Jorissen, R.N., Nice, E.C., Burgess, A.W., Ward, C.W., 2002. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 110, 763-773.
- Gorre, M.E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P.N., Sawyers, C.L., 2001. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293, 876-880.
- Goudar, R.K., Shi, Q., Hjelmeland, M.D., Keir, S.T., McLendon, R.E., Wikstrand, C.J., Reese, E.D., Conrad, C.A., Traxler, P., Lane, H.A., Reardon, D.A., Cavenee, W.K., Wang, X.F., Bigner, D.D., Friedman, H.S., Rich, J.N., 2005. Combination therapy of inhibitors of epidermal growth factor receptor/vascular endothelial growth factor receptor 2 (AEE788) and the mammalian target of rapamycin (RAD001) offers improved glioblastoma tumor growth inhibition. *Mol Cancer Ther* 4, 101-112.
- Gril, B., Palmieri, D., Bronder, J.L., Herring, J.M., Vega-Valle, E., Feigenbaum, L., Liewehr, D.J., Steinberg, S.M., Merino, M.J., Rubin, S.D., Steeg, P.S., 2008. Effect of lapatinib on the outgrowth of metastatic breast cancer cells to the brain. *J Natl Cancer Inst* 100, 1092-1103.

- Gupta, P.B., Chaffer, C.L., Weinberg, R.A., 2009. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med* 15, 1010-1012.
- Gurney, J.G., Kadan-Lottick, N., 2001. Brain and other central nervous system tumors: rates, trends, and epidemiology. *Curr Opin Oncol* 13, 160-166.
- Haas-Kogan, D.A., Prados, M.D., Tihan, T., Eberhard, D.A., Jelluma, N., Arvold, N.D., Baumber, R., Lamborn, K.R., Kapadia, A., Malec, M., Berger, M.S., Stokoe, D., 2005. Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib. *J. Natl. Cancer Inst.* 97, 880–887.
- Halatsch, M.E., Gehrke, E., Borhani, F.A., Efferth, T., Werner, C., Nomikos, P., Schmidt, U., Buchfelder, M., 2003. EGFR but not PDGFR-beta expression correlates to the antiproliferative effect of growth factor withdrawal in glioblastoma multiforme cell lines. *Anticancer Res* 23, 2315-2320.
- Halatsch, M.E., Gehrke, E.E., Vougioukas, V.I., Botefur, I.C., F, A.B., Efferth, T., Gebhart, E., Domhof, S., Schmidt, U., Buchfelder, M., 2004. Inverse correlation of epidermal growth factor receptor messenger RNA induction and suppression of anchorage-independent growth by OSI-774, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in glioblastoma multiforme cell lines. *J Neurosurg* 100, 523-533.
- Halatsch, M.E., Schmidt, U., Botefur, I.C., Holland, J.F., Ohnuma, T., 2000. Marked inhibition of glioblastoma target cell tumorigenicity in vitro by retrovirus-mediated transfer of a hairpin ribozyme against deletion-

- mutant epidermal growth factor receptor messenger RNA. *J Neurosurg* 92, 297-305.
- Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., Hamou, M.F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J.E., Hau, P., Mirimanoff, R.O., Cairncross, J.G., Janzer, R.C., Stupp, R., 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 997-1003.
- Holland, E.C., 2001. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet* 2, 120-129.
- Jura, N., Endres, N.F., Engel, K., Deindl, S., Das, R., Lamers, M.H., Wemmer, D.E., Zhang, X., Kuriyan, J., 2009. Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell* 137, 1293-1307.
- Karpel-Massler, G., Schmidt, U., Unterberg, A., Halatsch, M.E., 2009. Therapeutic inhibition of the epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas: where do we stand? *Mol Cancer Res* 7, 1000-1012.
- Kleihues, P., Ohgaki, H., 1999. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol* 1, 44-51.
- Klingler-Hoffmann, M., Bukczynska, P., Tiganis, T., 2003. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signaling negates the growth advantage imparted by a mutant epidermal growth factor receptor on human glioblastoma cells. *Int J Cancer* 105, 331-339.
- Klonisch, T., Wiechec, E., Hombach-Klonisch, S., Ande, S.R., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K., Los, M., 2008. Cancer stem cell markers in

- common cancers - therapeutic implications. *Trends Mol Med* 14, 450-460.
- Kreisl, T.N., Lassman, A.B., Mischel, P.S., Rosen, N., Scher, H.I., Teruya-Feldstein, J., Shaffer, D., Lis, E., Abrey, L.E., 2009. A pilot study of everolimus and gefitinib in the treatment of recurrent glioblastoma (GBM). *J. Neurooncol.* 92, 99–105.
- Krex, D., Klink, B., Hartmann, C., von Deimling, A., Pietsch, T., Simon, M., Sabel, M., Steinbach, J.P., Heese, O., Reifenberger, G., Weller, M., Schackert, G., 2007. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 130, 2596-2606.
- Lal, A., Glazer, C.A., Martinson, H.M., Friedman, H.S., Archer, G.E., Sampson, J.H., Riggins, G.J., 2002. Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer Res* 62, 3335-3339.
- Lammerts van Bueren, J.J., Bleeker, W.K., Brannstrom, A., von Euler, A., Jansson, M., Peipp, M., Schneider-Merck, T., Valerius, T., van de Winkel, J.G., Parren, P.W., 2008. The antibody zalutumumab inhibits epidermal growth factor receptor signaling by limiting intra- and intermolecular flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6109-6114.
- Levitzki, A., Gazit, A., 1995. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 267, 1782-1788.
- Libermann, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M.D., Ullrich, A., Schlessinger, J., 1985. Amplification,

enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature* 313, 144-147.

Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L., Yu, J.S., 2006. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 5, 67.

Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., Louis, D.N., Christiani, D.C., Settleman, J., Haber, D.A., 2004. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350, 2129-2139.

Marie, Y., Carpentier, A.F., Omuro, A.M., Sanson, M., Thillet, J., Hoang-Xuan, K., Delattre, J.Y., 2005. EGFR tyrosine kinase domain mutations in human gliomas. *Neurology* 64, 1444-1445.

Martinez, R., Schackert, H.K., Plaschke, J., Baretton, G., Appelt, H., Schackert, G., 2004. Molecular mechanisms associated with chromosomal and microsatellite instability in sporadic glioblastoma multiforme. *Oncology* 66, 395-403.

Massague, J., Pandiella, A., 1993. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 62, 515-541.

Meira, D.D., Nobrega, I., de Almeida, V.H., Mororo, J.S., Cardoso, A.M., Silva, R.L., Albano, R.M., Ferreira, C.G., 2009. Different antiproliferative

- effects of matuzumab and cetuximab in A431 cells are associated with persistent activity of the MAPK pathway. *Eur J Cancer* 45, 1265-1273.
- Mellinghoff, I.K., Wang, M.Y., Vivanco, I., Haas-Kogan, D.A., Zhu, S., Dia, E.Q., Lu, K.V., Yoshimoto, K., Huang, J.H., Chute, D.J., Riggs, B.L., Horvath, S., Liau, L.M., Cavenee, W.K., Rao, P.N., Beroukhi, R., Peck, T.C., Lee, J.C., Sellers, W.R., Stokoe, D., Prados, M., Cloughesy, T.F., Sawyers, C.L., Mischel, P.S., 2005. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med* 353, 2012-2024.
- Mendelsohn, J., Baselga, J., 2006. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol* 33, 369-385.
- Minkovsky, N., Berezov, A., 2008. BIBW-2992, a dual receptor tyrosine kinase inhibitor for the treatment of solid tumors. *Curr Opin Investig Drugs* 9, 1336-1346.
- Moscatello, D.K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A.K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P.W., Biegel, J.A., Hayes, R.L., Wong, A.J., 1995. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res.* 55, 5536–5539.
- Moyer, J.D., Barbacci, F.G., Iwata, K.K., Arnold, L., Boman, B., Cunningham, A., DiOrio, C., Doty, J., Morin, M.J., Moyer, M.P., Neveu, M., Pollack, V.A., Pustilnik, L.R., Reynolds, M.M., Sloan, D., Theleman, A., Miller, P., 1997. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res* 57, 4838-4848.

- Murat, A., Migliavacca, E., Gorlia, T., Lambiv, W.L., Shay, T., Hamou, M.F., de Tribolet, N., Regli, L., Wick, W., Kouwenhoven, M.C., Hainfellner, J.A., Heppner, F.L., Dietrich, P.Y., Zimmer, Y., Cairncross, J.G., Janzer, R.C., Domany, E., Delorenzi, M., Stupp, R., Hegi, M.E., 2008. Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol* 26, 3015-3024.
- Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W.K., Huang, H.J., 1996. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res* 56, 5079-5086.
- Narayana, A., Kelly, P., Golfinos, J., Parker, E., Johnson, G., Knopp, E., Zagzag, D., Fischer, I., Raza, S., Medabalmi, P., Eagan, P., Gruber, M.L., 2009. Antiangiogenic therapy using bevacizumab in recurrent high-grade glioma: impact on local control and patient survival. *J Neurosurg* 110, 173-180.
- Neyns, B., Sadones, J., Joosens, E., Bouttens, F., Verbeke, L., Baurain, J.F., D'Hondt, L., Strauven, T., Chaskis, C., In't Veld, P., Michotte, A., De Greve, J., 2009. Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma. *Ann Oncol*.
- Nicholas, M.K., Lukas, R.V., Jafri, N.F., Faoro, L., Salgia, R., 2006. Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clin Cancer Res* 12, 7261-7270.

- Nishikawa, R., Ji, X.D., Harmon, R.C., Lazar, C.S., Gill, G.N., Cavenee, W.K., Huang, H.J., 1994. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7727-7731.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P.L., Burkhard, C., Schuler, D., Probst-Hensch, N.M., Maiorka, P.C., Baeza, N., Pisani, P., Yonekawa, Y., Yasargil, M.G., Lutolf, U.M., Kleihues, P., 2004. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 64, 6892-6899.
- Ohgaki, H., Kleihues, P., 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170, 1445-1453.
- Paez, J.G., Janne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggon, T.J., Naoki, K., Sasaki, H., Fujii, Y., Eck, M.J., Sellers, W.R., Johnson, B.E., Meyerson, M., 2004. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497-1500.
- Pedersen, M.W., Pedersen, N., Ottesen, L.H., Poulsen, H.S., 2005. Differential response to gefitinib of cells expressing normal EGFR and the mutant EGFRvIII. *Br J Cancer* 93, 915-923.
- Peeters, M., Balfour, J., Arnold, D., 2008. Review article: panitumumab--a fully human anti-EGFR monoclonal antibody for treatment of metastatic colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 28, 269-281.
- Piccirillo, S.G., Reynolds, B.A., Zanetti, N., Lamorte, G., Binda, E., Broggi, G., Brem, H., Olivi, A., Dimeco, F., Vescovi, A.L., 2006. Bone

morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 444, 761-765.

- Pollack, V.A., Savage, D.M., Baker, D.A., Tsaparikos, K.E., Sloan, D.E., Moyer, J.D., Barbacci, E.G., Pustilnik, L.R., Smolarek, T.A., Davis, J.A., Vaidya, M.P., Arnold, L.D., Doty, J.L., Iwata, K.K., Morin, M.J., 1999. Inhibition of epidermal growth factor receptor-associated tyrosine phosphorylation in human carcinomas with CP-358,774: dynamics of receptor inhibition in situ and antitumor effects in athymic mice. *J Pharmacol Exp Ther* 291, 739-748.
- Prados, M.D., Lamborn, K.R., Chang, S., Burton, E., Butowski, N., Malec, M., Kapadia, A., Rabbitt, J., Page, M.S., Fedoroff, A., Xie, D., Kelley, S.K., 2006. Phase 1 study of erlotinib HCl alone and combined with temozolomide in patients with stable or recurrent malignant glioma. *Neuro Oncol* 8, 67-78.
- Preusser, M., Gelpi, E., Rottenfusser, A., Dieckmann, K., Widhalm, G., Dietrich, W., Bertalanffy, A., Prayer, D., Hainfellner, J.A., Marosi, C., 2008. Epithelial Growth Factor Receptor Inhibitors for treatment of recurrent or progressive high grade glioma: an exploratory study. *J. Neurooncol.* 89, 211–218.
- Prigent, S.A., Nagane, M., Lin, H., Huvar, I., Boss, G.R., Feramisco, J.R., Cavenee, W.K., Huang, H.S., 1996. Enhanced tumorigenic behavior of glioblastoma cells expressing a truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras-Shc-Grb2 pathway. *J Biol Chem* 271, 25639-25645.

- Quang, T.S., Brady, L.W., 2004. Radioimmunotherapy as a novel treatment regimen: 125I-labeled monoclonal antibody 425 in the treatment of high-grade brain gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58, 972-975.
- Rabindran, S.K., Discafani, C.M., Rosfjord, E.C., Baxter, M., Floyd, M.B., Golas, J., Hallett, W.A., Johnson, B.D., Nilakantan, R., Overbeek, E., Reich, M.F., Shen, R., Shi, X., Tsou, H.R., Wang, Y.F., Wissner, A., 2004. Antitumor activity of HKI-272, an orally active, irreversible inhibitor of the HER-2 tyrosine kinase. *Cancer Res* 64, 3958-3965.
- Raizer, J.J., 2005. HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitors for the treatment of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 74, 77-86.
- Reardon, D.A., Desjardins, A., Vredenburgh, J.J., Gururangan, S., Friedman, A.H., Herndon, J.E., 2nd, Marcello, J., Norfleet, J.A., McLendon, R.E., Sampson, J.H., Friedman, H.S., 2009. Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol*.
- Rivera, F., Salcedo, M., Vega, N., Blanco, Y., Lopez, C., 2009. Current situation of zalutumumab. *Expert Opin Biol Ther* 9, 667-674.
- Ropolo, M., Daga, A., Griffero, F., Foresta, M., Casartelli, G., Zunino, A., Poggi, A., Cappelli, E., Zona, G., Spaziante, R., Corte, G., Frosina, G., 2009. Comparative analysis of DNA repair in stem and nonstem glioma cell cultures. *Mol Cancer Res* 7, 383-392.
- Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F., Normanno, N., 1995. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19, 183-232.

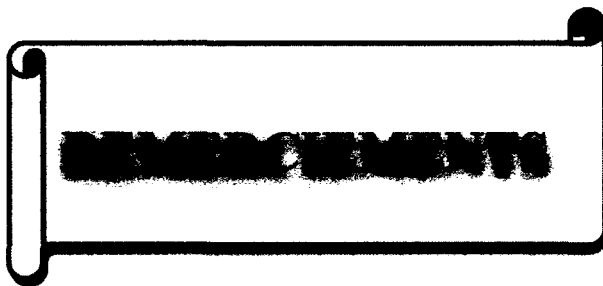
- Sampson, J.H., Akabani, G., Archer, G.E., Bigner, D.D., Berger, M.S., Friedman, A.H., Friedman, H.S., Herndon, J.E., 2nd, Kunwar, S., Marcus, S., McLendon, R.E., Paolino, A., Penne, K., Provenzale, J., Quinn, J., Reardon, D.A., Rich, J., Stenzel, T., Tourt-Uhlig, S., Wikstrand, C., Wong, T., Williams, R., Yuan, F., Zalutsky, M.R., Pastan, I., 2003. Progress report of a Phase I study of the intracerebral microinfusion of a recombinant chimeric protein composed of transforming growth factor (TGF)-alpha and a mutated form of the Pseudomonas exotoxin termed PE-38 (TP-38) for the treatment of malignant brain tumors. *J Neurooncol* 65, 27-35.
- Sandstrom, M., Johansson, M., Bergstrom, P., Bergenheim, A.T., Henriksson, R., 2008. Effects of the VEGFR inhibitor ZD6474 in combination with radiotherapy and temozolomide in an orthotopic glioma model. *J Neurooncol* 88, 1-9.
- Sawyers, C., 2004. Targeted cancer therapy. *Nature* 432, 294-297.
- Schittenhelm, M.M., Kollmannsberger, C., Oechsle, K., Harlow, A., Morich, J., Honecker, F., Kurek, R., Storkel, S., Kanz, L., Corless, C.L., Wong, K.K., Bokemeyer, C., Heinrich, M.C., 2009. Molecular determinants of response to matuzumab in combination with paclitaxel for patients with advanced non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther* 8, 481-489.
- Schmiedel, J., Blaukat, A., Li, S., Knochel, T., Ferguson, K.M., 2008. Matuzumab binding to EGFR prevents the conformational rearrangement required for dimerization. *Cancer Cell* 13, 365-373.

- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E.R., Morrison, S.J., 2009. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* 138, 822-829.
- Shinojima, N., Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Kochi, M., Nakamura, H., Makino, K., Saya, H., Hirano, H., Kuratsu, J., Oka, K., Ishimaru, Y., Ushio, Y., 2003. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 63, 6962-6970.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., Dirks, P.B., 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.
- Smith, J.S., Jenkins, R.B., 2000. Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Front Biosci* 5, D213-231.
- Sulman, E., Aldape, K., Colman, H., 2008. Brain tumor stem cells. *Curr Probl Cancer* 32, 124-142.
- Taberner, J., 2007. The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents. *Mol Cancer Res* 5, 203-220.
- Takasu, S., Takahashi, T., Okamoto, S., Oriuchi, N., Nakayashiki, N., Okamoto, K., Muramatsu, H., Hayashi, T., Nakahara, N., Mizuno, M., Wakabayashi, T., Higuchi, T., Endo, K., Kozaki, K., Miyaishi, O., Saga, S., Ueda, R., Yoshida, J., Yoshikawa, K., 2003. Radioimmunosciintigraphy of intracranial glioma xenograft with a technetium-99m-labeled mouse monoclonal antibody specifically recognizing type III mutant epidermal growth factor receptor. *J Neurooncol* 63, 247-256.

- Talavera, A., Friemann, R., Gomez-Puerta, S., Martinez-Fleites, C., Garrido, G., Rabasa, A., Lopez-Requena, A., Pupo, A., Johansen, R.F., Sanchez, O., Krenzel, U., Moreno, E., 2009. Nimotuzumab, an antitumor antibody that targets the epidermal growth factor receptor, blocks ligand binding while permitting the active receptor conformation. *Cancer Res* 69, 5851-5859.
- Torres, L.A., Perera, A., Batista, J.F., Hernandez, A., Crombet, T., Ramos, M., Neninger, E., Perez, M., Sanchez, E.L., Romero, S., Aguilar, V., Coca, M.A., Iznaga-Escobar, N., 2005. Phase I/II clinical trial of the humanized anti-EGF-r monoclonal antibody h-R3 labelled with ^{99m}Tc in patients with tumour of epithelial origin. *Nucl Med Commun* 26, 1049-1057.
- Traxler, P., Allegrini, P.R., Brandt, R., Brueggen, J., Cozens, R., Fabbro, D., Grosios, K., Lane, H.A., McSheehy, P., Mestan, J., Meyer, T., Tang, C., Wartmann, M., Wood, J., Caravatti, G., 2004. AEE788: a dual family epidermal growth factor receptor/ErbB2 and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res* 64, 4931-4941.
- von Deimling, A., Louis, D.N., Wiestler, O.D., 1995. Molecular pathways in the formation of gliomas. *Glia* 15, 328-338.
- von Deimling, A., von Ammon, K., Schoenfeld, D., Wiestler, O.D., Seizinger, B.R., Louis, D.N., 1993. Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol* 3, 19-26.

- Ward, C.W., Lawrence, M.C., Streltsov, V.A., Adams, T.E., McKern, N.M., 2007. The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation. *Trends Biochem Sci* 32, 129-137.
- Weihua, Z., Tsan, R., Huang, W.C., Wu, Q., Chiu, C.H., Fidler, I.J., Hung, M.C., 2008. Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity. *Cancer Cell* 13, 385-393.
- Weil, R.J., 2008. Incorporating molecular tools into early-stage clinical trials. *PLoS Med* 5, e21.
- Wicha, M.S., Liu, S., Dontu, G., 2006. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* 66, 1883-1890; discussion 1895-1886.
- Wong, A.J., Ruppert, J.M., Bigner, S.H., Grzeschik, C.H., Humphrey, P.A., Bigner, D.S., Vogelstein, B., 1992. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2965-2969.
- Yamazaki, H., Kijima, H., Ohnishi, Y., Abe, Y., Oshika, Y., Tsuchida, T., Tokunaga, T., Tsugu, A., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Nakamura, M., 1998. Inhibition of tumor growth by ribozyme-mediated suppression of aberrant epidermal growth factor receptor gene expression. *J Natl Cancer Inst* 90, 581-587.
- Yamazaki, H., Ohba, Y., Tamaoki, N., Shibuya, M., 1990. A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors. *Jpn J Cancer Res* 81, 773-779.

- Yang, W., Barth, R.F., Wu, G., Tjarks, W., Binns, P., Riley, K., 2009. Boron neutron capture therapy of EGFR or EGFRvIII positive gliomas using either boronated monoclonal antibodies or epidermal growth factor as molecular targeting agents. *Appl Radiat Isot* 67, S328-331.
- Yang, W., Wu, G., Barth, R.F., Swindall, M.R., Bandyopadhyaya, A.K., Tjarks, W., Tordoff, K., Moeschberger, M., Sferra, T.J., Binns, P.J., Riley, K.J., Ciesielski, M.J., Fenstermaker, R.A., Wikstrand, C.J., 2008. Molecular targeting and treatment of composite EGFR and EGFRvIII-positive gliomas using boronated monoclonal antibodies. *Clin Cancer Res* 14, 883-891.
- Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B.M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B., Herold-Mende, C.C., 2008. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res* 14, 123-129.
- Zhang, Y., Boado, R.J., Pardridge, W.M., 2003. In vivo knockdown of gene expression in brain cancer with intravenous RNAi in adult rats. *J Gene Med* 5, 1039-1045.
- Zhang, Y., Zhang, Y.F., Bryant, J., Charles, A., Boado, R.J., Pardridge, W.M., 2004. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin Cancer Res* 10, 3667-3677.
- Zhang, Y., Zhu, C., Pardridge, W.M., 2002. Antisense gene therapy of brain cancer with an artificial virus gene delivery system. *Mol Ther* 6, 67-72.



Aux Examineurs

Pour l'honneur que vous me faites d'accepter de juger ce travail. Vos conseils, vos suggestions et vos critiques m'ont été très utiles pour améliorer ce travail.

Pr Josée Hébert, Pr Marcel Bastin, Pr Cherif Abou-Elela et Pr Régen Drouin.

À mon Directeur de Recherche, le **Dr Régen Drouin**, pour la confiance que vous avez placée en moi. Vous m'avez aidé et encouragé. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mes remerciements les plus sincères.

Aux chercheurs-collaborateurs du projet « Glioma-Project » :

Dr Ana-Maria Crous-Tsanaclis et Dr David Fortin pour votre excellente collaboration, le travail d'équipe et les échanges scientifiques. Sans vous ce projet n'aurait pas vu le jour. Veuillez trouver à travers ces quelques mots l'expression de ma reconnaissance et de mes remerciements les plus sincères.

Dr Sabina Mai et Dr Thomas Klonisch pour votre excellente collaboration, le travail d'équipe et les échanges scientifiques. Veuillez trouver à travers ces quelques mots l'expression de ma profonde reconnaissance et de mes remerciements les plus sincères.

Dr David Mathieu pour sa collaboration

Aux autres chercheurs du laboratoire

Dr Chantal Bouffard : pour les échanges en éthique donnant un caractère multidisciplinaire au laboratoire.

Dr Kada Krabchi : mon Doyen et grand frère pour les travaux accomplis ensemble ainsi que les relations socio-affectives réciproques.

Dr Ju Yan : pour sa collaboration, le travail d'équipe et les travaux effectués ensemble.

Aux secrétaires: mesdames Denise Fortier, Malika Zaidi et Marcelle Maguire pour votre soutien, votre amitié et les relations socio-affectives réciproques.

Aux étudiants: mon jeune frère Oumar Samassekou, mon frère Walid Dridi, Seemi Ayub, Marie-Chantal Grégoire, Josée Mercier, Ahmed Emad, Claire-Marie Legendre, Adeline, Jean François, Sandrine Lacoste, Josée Lavoie, Patrick Rochette, Christiane Aurey-Blais, mon frère Alhousseynou Sall, Atef et tous les étudiants sans oublier personne....

Aux Assistants de Recherche: Nathalie Bastien, Josée Lamoureux, Marc Bronsard, Isabelle Paradis, Eric Bouchard

Aux technologistes du laboratoire clinique et à tout le personnel

Au Professeur **Lamine Diakhaté**, ex Directeur du Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS), au Professeur **Doudou Thiam**, ex Doyen de la faculté de médecine de pharmacie et d'odonto-stomatologie de Dakar et au Doyen Professeur **Cheikh Saadibou-Boye** de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD).

À tout le personnel du CNTS et de la faculté de médecine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie de l'UCAD.

À toute ma famille mon grand frère **Bassirou**, mes frères et sœurs **Mamadou Moustapha, Mame Atta (Bigué), Khoudia, Fatou Khady (Fa), Ada Mbow, Mame Ndoussé** et leurs familles pour leur sens élevé de la famille.

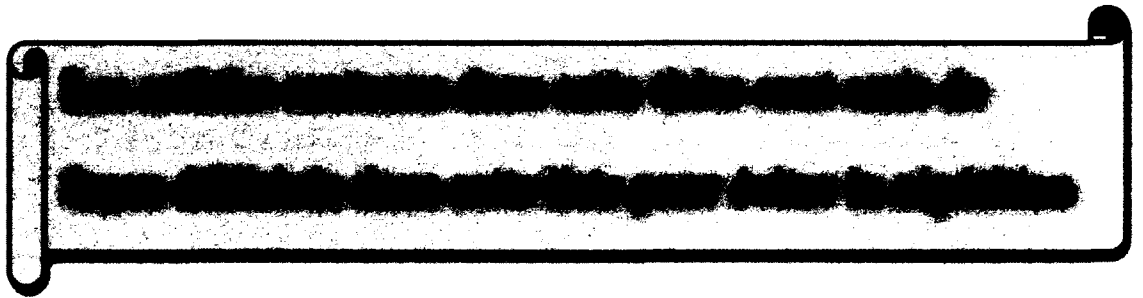
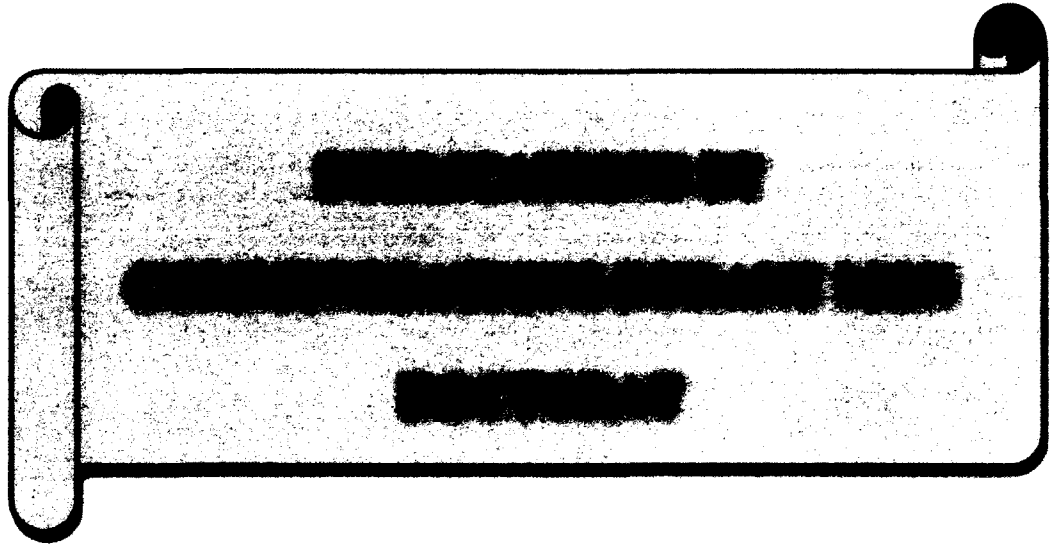
À tous mes amis, mes frères et soeurs, à mes pères et mères, à mes oncles et tantes, à mes cousins, à mes neveux et nièces, à mes beaux-frères et belles soeurs et à toute la communauté nguithioise.

Aux étudiants sénégalais à Sherbrooke et au Canada

À tous mes parents et à ma belle-famille

À la communauté musulmane de Sherbrooke et du Québec/Canada

À mon pays d'origine le Sénégal et à mon pays d'adoption le Québec/Canada



Chapitres de livres

1) **Gadji M.**, Krabchi K., Yan J, and Drouin R. (2007) Application of Multi-PRINS to Simultaneously Identify Chromosomes 18, X, and Y in Prenatal Diagnosis. From: *Methods in Molecular Biology*, vol. 444: *Prenatal Diagnosis*, Edited by: S. Hahn and L. G. Jackson © Humana Press, Totowa, NJ, 49-59.

2) Krabchi K., **Gadji M.**, Yan J. and Drouin R. (2007). Identification of all fetal nucleated cells in maternal blood using PRINS technique. From *PRINS and PNA Technologies in Chromosomal Investigation*, Edited by: F. Pellestor © Nova Science Publishers Inc., Hauppauge NY, 37-52

3) Krabchi K., **Gadji M.**, Yan J. and Drouin R. (2006). Dual-colour PRINS for In Situ detection of fetal cells in maternal blood. From *Methods in Molecular Biology*, vol. 334: *PRINS and In Situ PCR Protocols, Second Ed.* Edited by: F. Pellestor © Humana Press Inc., Totowa, NJ, 141-149.

4) Yan J., **Gadji M.**, Krabchi K. and Drouin R. (2006). New Rapid Multicolor PRINS Protocol. From *Methods in Molecular Biology*, vol. 334: *PRINS and In Situ PCR Protocols, Second Ed.* Edited by: F. Pellestor © Humana Press Inc., Totowa, NJ, 141-149.

Articles publiés

- 1) **Gadji M**, Krabchi K, Langis P, Aboura A, Périgny M, Côté S, Ferland M, Drouin R. Prenatal diagnosis and molecular characterization of two constitutional rings derived from one chromosome 22 (Manuscript en revision à American Journal of Medical Genetics).

- 2- Dridi W., Krabchi K., **Gadji M.**, Lavoie J., Bronsard M., Fetni R., Drouin R. (2005) [Activité dominante négative des protéines p53 mutées.] Med, Sci. (Paris). 2006 Mar;22(3):301-7. Review. French.

- 3- Krabchi K., **Gadji M.**, Forest J-C., and Drouin R. (2006) Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood in different cases of aneuploidies. Clin Genet. 2006 Feb;69(2) :145-54.

- 4- Krabchi K., **Gadji M.**, Samassekou O., Grégoire M-C., Forest J-C., Drouin R. (2006) Quantification of fetal nucleated cells in maternal blood of pregnant women with a male trisomy 21 fetus using molecular cytogenetic techniques. Prenat Diagn. 2006 Jan;26(1) : 28-34.

- 5) **Gadji M.**, Krabchi K, Drouin R. (2005). Simultaneous identification of chromosomes 18, X and Y in uncultured amniocytes by using multi-primed *in situ* labelling technique. Clin Genet. 2005 Jul;68(1):15-22.

Articles soumis ou en preparation

1) **Gadji M** , Krabchi K , Ferland M, Bronsard M , Bastide A, Ardilouze JL , Caron C, Langevin A, Drouin R. Heterokaryotic monozygotic twins in a familial history of dizygotic twins (Manuscript en préparation)

2) Ayub seemi, **Gadji Macoura**, Krabchi Kada, Côté Sylvie, Gekas Jean³, Maranda Bruno, Drouin Régen Three New Cases of Terminal Deletion of the Long Arm of Chromosome 7 and Literature Review: Evidence that there is no 7q deletion syndrome (Manuscript en préparation)

Dans le cadre du projet « Glioma-Project »

1) **Gadji M.**, Fortin D., Tsanaclis A.M.C., Yan J., Reddy J.J., Klonisch T., Drouin R. and Mai S. Cellular mechanisms of recurrence in Glioblastomas (article 1 en préparation)

2) **Gadji M.**, Tsanaclis A.M.C., Fortin D., Yan J., Reddy J.J., Klonisch T., Drouin R. and Mai S. Cellular mechanisms of recurrence in oligodendrogliomas (article 2 en préparation)

3) Oligodendroglioma: chromosome arms 1p and 19q as a diagnostic marker (Chapitre de livre sur invitation) édité par M A Hayat distinguished professor at Kean University union, Springer company is planning to publish a five-volume series in the field of tumors of the central nervous system

4) Nuclear telomere architecture as biomarker in gliomas (Chapitre de livre sur invitation) édité par M A Hayat distinguished professor at Kean University union, Springer company is planning to publish a five-volume series in the field of tumors of the central nervous system

Conférencier Invité

1- Signification de la délétion 1p/19q dans la prise en charge des tumeurs oligodendrogiales. Congrès de l'Association des Neurochirurgiens du Québec (ANCQ) Manoir Rouville-Campbell ; 13 et 14 novembre 2009

2- Méthodes de génétique moléculaire pour le diagnostic des tumeurs cérébrales
Journée de formation continue de Neurophatologie de la faculté de Médecine et des Sciences de la Santé de l'université de Sherbrooke, 2 octobre 2009 Hôtel Estrimont, Magog-Orford

Communications

- **Gadji M.**, Fortin D., Tsanaclis A.M.C., Yan J., Reddy J.J., Klonisch T., Drouin R. and Mai S. Cellular mechanisms of recurrence in Glioblastomas.

Orale, 7th Canadian Symposium on Telomeres and Telomerase. McMaster University Hamilton; 13-16 May 2010.

- Drouin R, Ayub S, **Gadji M**, Cote S, Krabchi.K. Molecular and cytogenetic characterization in a case of terminal deletion 7q36 and literature review.

Poster, 58th Congress of the American Society of Human Genetic. Philadelphia, Pennsylvania. USA. Nov. 11-15, 2008.

- Ayub S, Samassekou O, Gregoire MC, **Gadji M**, Emad A, Bouchard, E. Drouin R. Detection of rare male cells surrounded by female cells using automated slide scanning

Poster, 58th Congress of the American Society of Human Genetic. Philadelphia, Pennsylvania. USA. Nov. 11-15, 2008.

- Emad A, Ayub S, Gregoire MC, Samassekou O, **Gadji M**, Hemmings F, Krabchi K, Drouin R. Validation of the manual scanning process to detect rare events using FISH technique

Poster, 58th Congress of the American Society of Human Genetic. Philadelphia, Pennsylvania. USA. Nov. 11-15, 2008.

- Ayub S, **Gadji M**, Côté S, Krabchi K, Drouin R. Caractérisation cytogénétique et moléculaire d'un cas de deletion chromosomique terminale 7q36

Orale, 50^e Réunion Annuelle du Club de Recherche Clinique du Québec (CRCQ). Le Manoir Richelieu, La Malbaie, Octobre 02-04, 2008, Québec. *medecine/sciences* 2008 Suppl. 2 vol 23, abstract 47, p 12.

- Ayub S, Samassekou O, Grégoire MC, **Gadji M**, Bouchard E, Drouin R. Ikoniscope validation to detect male cells surrounded by female cells for non invasive prenatal diagnosis.

Poster, 14th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, 1-4 Juin 2008, Vancouver, Canada

- **Gadji M**, Fortin D., Tsanaclis AM., Drouin R. Caractérisation cytogénétique et moléculaire des tumeurs cérébrales primaires ou gliomes.

Orale, Journées génétiques du Réseau de Médecine Génétique Appliquée (RMGA), 14-16 mai 2008, Québec, Québec, Canada

- Ayub S, Samassekou O, Grégoire MC, **Gadji M**, Bouchard E, Drouin R. Validation et comparaison du balayage automatisé de lame avec le balayage manuel dans l'identification de cellules mâles rares parmi des millions de cellules femelles.

Orale, 25^e Réunion Annuelle de l'Association de Cytogénétique du Québec. Hôpital de Montréal pour enfants du Centre hospitalier universitaire de McGill Montréal, Québec 25 Avril 2008

- Ayub S, **Gadji M**, Côté S, Krabchi K, Drouin R. Molecular and cytogenetic characterization in a case of terminal deletion 7q36.2.

Poster, 2^e Journée Scientifique de l'Axe Mère Enfant du Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel du CHUS, Sherbrooke, 18 Avril 2008

- **Gadji M**, Tsanaclis AM., Fortin D., Drouin R. Aneuploidy and chromosomal instability in gliomas

Poster, 101^d Congress of the American Association for Cancer Research. San Diego. California. USA. April. 12-16, 2008. *Proceedings*. April. 2008. Vol. 49, résumé 4331*, p.1031.

- **Gadji W**, Fortin D, Tsanaclis AM, Drouin R: Chromosomal and molecular signatures of gliomas. **Poster**, 15th Annual Clinical Genetics Meeting of American College of Medical Genetics, Résumé #98, p. 126, Phoenix, AR, Mars 2008.

- **Gadji M**, Fortin D., Tsanaclis AM., Drouin R. Instabilité chromosomique et aneuploïdie dans les gliomes.

Poster, 4^e Assises de Génétique Humaine et Médicale, 17-19 Janvier 2008, 17-19 janvier 2008, Lille - Grand Palais - France.

- **Gadji M**, Tsanaclis AM., Fortin D., Drouin R. Cytogenetic investigation of cultured oligodendroglioma cells.

Poster, Canadian College of Medical Genetics (CCMG) Annual Scientific Meeting – Vancouver, British Columbia, November 14-18, 2007

- **Gadji M**, Tsanaclis AM., Fortin D., Drouin R. Chromosomal and molecular signatures of oligodendrogliomas.

Poster, 57th Congress of the American Society of Human Genetic. San Diego, California. USA. Oct. 23-27, 2007.

- **Gadji M**, Fortin D, Tsanaclis AM, Drouin R. La délétion 1p/19q comme outil diagnostique des oligodendrogliomes.

Poster, 48^e Réunion Annuelle du Club de Recherche Clinique du Québec. Mont-Tremblant, 20-22 Septembre 07, Québec. *medecine/sciences* 2007 Suppl. 2 vol 23, résumé 47, p 12.

- Drouin R, **Gadji M**, Tsanaclis A-M, Fortin D: Genetic characterization of oligodendrogliomas.

Poster, 6th European Cytogenetics Conference, Chromosome Research, Vol 15, no. 1, Résumé 7.113-P, Page 221, Istanbul, Turquie, Juillet 2007.

- **Gadji M**, Samassekou O, Hemmings F, Ayub S, Bouchard E, Kilpatrick MW, Tafas T, Tsipouras P, Krabchi K, Drouin R: Automated detection of rare male fetal cells in peripheral blood of pregnant women using molecular cytogenetic techniques.

Poster, 6th European Cytogenetics Conference, Chromosome Research, Vol 15, no. 1, Résumé 12.30-P, Page 256, Istanbul, Turquie, Juillet 2007.

- **M. Gadji**, D. Fortin, A. M. Tsanaclis, R. Drouin Étude cytogénétique et moléculaire de la délétion 1p/19q dans les oligodendrogliomas

Orale, 24^e Réunion Annuelle de l'Association de Cytogénétique du Québec. Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Québec. 18 Mai 2007

- **M. Gadji**, A. M. Tsanaclis, D. Fortin, R. Drouin. Molecular characterization of low- and high-grade oligodendrogliomas.

Poster, 56th Congress of the American Society of Human Genetic. New Orleans, Louisiana. USA. Oct. 9-13, 2006.

- **M. Gadji**, D. Fortin, A. M. Tsanaclis, R. Drouin. Cytogenetic and molecular investigations of oligodendrogliomas

Oral and Poster, Annual Scientific Meeting of Canadian College of Medical Geneticists. 20th-23rd April 2006. Saint-Sauveur, Montréal, Québec, Canada.

- **M. Gadji**, K. Krabchi, M. Ferland, M. Bronsard, A. Bastide, J-L. Ardilouze, C. Caron, A. Langevin, R. Drouin. Caractérisation Cytogénétique et moléculaire d'un cas de gémellité monozygote hétérocaryote dans un contexte familial de gémellité dizygote

Poster, 3^e Assises de Génétique Humaine et Médicale, 26-27-28 Janvier 2006, le CORUM- Montpellier, France.

- **M. Gadji**, D. Fortin, A. M. Tsanaclis, R. Drouin. Étude cytogénétique et moléculaire chez 30 cas d' oligodendrogliomas

Poster, 3^e Assises de Génétique Humaine et Médicale, 26-27-28 Janvier 2006, le CORUM- Montpellier, France.

- **Gadji M**, Misiakila JLM (RP). Art de guérir: ethnothérapie et son éthique chez les N'Tsong dans la région de Bandundu, République démocratique du Congo. Exemple de PROMETRA au Sénégal.

Orale, 1^{ière} journée d'étude de l'Institut International de Recherche en Éthique Biomédicale (IIREB) tenue à Sherbrooke, Québec, Canada (19 janvier 2006)

- **M. Gadji**, K. Krabchi, M. Ferland, M. Bronsard, A. Bastide, J-L. Ardilouze, C. Caron, A. Langevin, R. Drouin. Heterokaryotic monozygotic dichorionic twins discordant for Turner syndrome.

Poster, 55th Congress of the American Society of Human Genetic. Salt Lake City, Utah. USA. Oct. 25-29, 2005.

- **M. Gadji**, K. Krabchi, M. Ferland, M. Bronsard, A. Bastide, J-L. Ardilouze, C. Caron, A. Langevin, R. Drouin. Investigations cytogénétique et moléculaire d'un cas de gémellité monozygote hétérocaryote.

Poster, 47^e Réunion Annuelle du Club de Recherche Clinique du Québec. Château Bromont, 29 Septembre au 1^{er} Octobre 2005, Québec. *medecine/sciences* 2005 Suppl. 2 vol 21, résumé 29, p 9.

- **M. Gadj**, K. Krabchi, M. Ferland, M. Bronsard, A. Bastide, J-L. Ardilouze, C. Caron, A. Langevin, R. Drouin. Prenatal diagnosis of heterokaryotic monozygotic dichorionic twins discordant for Turner syndrome in a recurrent familial dizygotic twins history.

Poster, CCMG Annual Scientific Meeting – Bromont, Québec, September 28 - October 02 / 2005

- K. Krabchi, **M. Gadj**, M. Ferland, M. Bronsard, A. Bastide, J-L. Ardilouze, C. Caron, A. Langevin, R. Drouin. Diagnostic prénatal de jumeaux monozygotes hétérocaryotes dichorioniques dans un contexte familial de gémellité dizygote.

Orale, 22^e Réunion Annuelle de l'Association de Cytogénétique du Québec. Château Bromont, 29 Avril 2005, Québec.

- **Gadj** M., Krabchi K., Ferland M., Côté S, Périgny M., Langis P., Drouin R. Molecular characterization of two constitutional rings derived from one chromosome 22 detected during prenatal diagnosis.

Poster, 54th Congress of the American Society of Human Genetic. Toronto. Ontario. Canada. October 26-30, 2004. . résumé publié dans *Am J. Hum. Genet.* Oct. 2004. Suppl. 2, résumé 1020*, p 199

- Krabchi. K.; **GADJI.M.**; Bronsard M. Forest. J-C.; Drouin.R. Quantification des cellules foetales circulant dans le sang maternel chez des femmes enceintes de foetus aneuploïdes en vue d'un diagnostic génétique prenatal non effractiv.

Orale, 2^{ème} journée annuelle du département de pédiatrie du CHUS et de l'Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada (21 mai 2004).

- Krabchi K., **Gadji M.**, Roy S., Côté S., Bronsard M., Périgny M., Langis P., Drouin R. Diagnostic prénatal et caractérisation de deux anneaux issus probablement du même chromosome 22.

Orale, 2^e Journée scientifique annuelle du département de pédiatrie. Institut de pharmacologie. Faculté de médecine, CHUS, Sherbrooke. Québec 21 mai 2004.

- Krabchi K, **Gadji M**, Forest JC, Drouin R. Nombre de cellules fœtales augmenté dans la circulation sanguine maternelle chez des femmes porteuses de grossesse aneuploïde.

Orale, 21^e Réunion Annuelle de l'Association de Cytogénétique du Québec. Université de Montréal, Pavillon Roger Gaudry. Montréal., Québec, 23 Avril 2004.

- **Gadji M.**, Krabchi K., Roy S., Côté S., Bronsard M., Périgny M., Langis P., Drouin R. Identification et caractérisation d'un chromosome 22 en anneau en période prénatale.

Orale, 21^e Réunion Annuelle de l'Association de Cytogénétique du Québec. Université de Montréal, Pavillon Roger Gaudry. Montréal., Québec, 23 Avril 2004.

- Krabchi K., **Gadji M.**, Ferland M., Bronsard M., Jackson L, Forest J.-C., Drouin R. (2003) Identification et quantification des cellules fœtales aneuploïdes circulant dans le sang maternel par méthodes cytogénétiques moléculaires.

Orale, 41^e Journée Scientifique Annuelle “Carlton Auger” de la Division de Pathologie du département de biologie médicale, faculté de médecine, université Laval, Québec, Manoir Montmorency, 31 oct. et 01 Nov. 2003. résumé publié dans *Annales de Pathologie*, (Février 2004), Vie des Sociétés, Vol.24, n° 1: 92.

- **Gadji M.**, Krabchi K., Roy S., Côté S., Périgny M., Bronsard M., Drouin R. (2003) Diagnostic prenatal et caractérisation d'un chromosome 22 en anneau.

Orale, 41^e Journée Scientifique Annuelle “Carlton Auger” de la Division de Pathologie du département de biologie médicale, faculté de médecine, université Laval, Québec, Manoir Montmorency, 31 oct. et 01 Nov. 2003. résumé publié dans *Annales de Pathologie*, (Février 2004), Vie des Sociétés, Vol.24, n° 1: 90-91.

- Krabchi K., **Gadji M.**, Jackson LG., Ferland M., Roy S., Bronsard M., Forest J.-C., Drouin R. Quantification of aneuploid fetal cells in peripheral blood of pregnant women using molecular cytogenetic techniques.

Poster, 53rd Congress of the American Society of Human Genetics. Los Angeles. California. USA. Nov. 04-09, 2003. *Am J. Hum. Genet.* Nov. 2003. Suppl. 2 to Vol. 73, No 5, Nov. 2003, résumé 803*, p. 307.

- **Gadji M.**, Krabchi K., Bronsard M., Drouin R. Application of the multi-PRINS technique for simultaneous detection of chromosomes 18, X and Y in uncultured amniocytes.

Poster, 53rd Congress of the Am. Soc. of Human Genetic. Los Angeles. California. USA. Nov. 04-09, 2003. *Am J. Hum. Genet.* Nov. 2003. Suppl. 2 to Vol. 73, No 5, Nov. 2003, résumé 2483*, p.591.

- **Gadji M.**, Krabchi K., Roy S., Côté S., Périgny M., Bronsard M., Drouin R. Prenatal diagnosis of a ring chromosome 22. 2003

Poster, Annual Scientific Meeting of Canadian College of Medical Geneticists. 16-19 October 2003. Edmonton, Alberta, Canada.

- Krabchi. K.; **GADJI.M.**; Jackson L.G.Ferland ;Roy.S.; Bronsard M.; Forest. J-C.; Drouin.R. Detection and quantification of aneuploid fetal cells in pregnant women blood using FISH and PRINS techniques.

Poster, Annual Scientific Meeting of CCMG (October, 16-19, 2003), Edmonton, Alberta, Canada.

- Krabchi K., **Gadji M.**, Bronsard M., Forest J-C., Drouin R. Quantification par les techniques FISH et PRINS des cellules fœtales circulant dans le sang maternel lors de grossesses aneuploïdes.

Poster, 45^e Réunion Annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec. Manoir des Sables, Orford, Québec, 25-27 Septembre 2003.

- Krabchi K., **Gadji M.**, Bronsard M., Forest J-C., Drouin R. Détection et quantification des cellules fœtales circulant dans le sang maternel lors de grossesses aneuploïdes par les techniques cytogénétiques moléculaires –

Orale, VII^e Congrès Scientifique Annuel du Regroupement des Biologistes Marocains au Canada. Hôtel Best Western Europa, Montréal, Québec, 24 Mai 2003.

- Krabchi K., **Gadji M.**, Al-Sabti K., Bronsard M., Forest J-C, Drouin R. Detection and quantification of all fetal nucleated cells from peripheral blood of pregnant women bearing aneuploid conceptus using molecular cytogenetic techniques.

Poster, 12th Annual Scientific Meeting of CGDN, Kananaskis Mountain Lodge, Alberta, 15-18 Mai 2003.

- **Gadji M.**, Krabchi K., Bronsard M., Drouin R. Étude comparative de la technique Multi-PRINS et la technique FISH dans la détection des chromosomes 18, X et Y sur les amniocytes non cultivés.

Poster, 5^e Journée de la Recherche de la Faculté de Médecine de l'Université Laval. Québec, Pavillon Alphonse-Desjardins, 8 mai 2003.

- **Gadji.M.**; Krabchi. K.; Bronsard. M.; Drouin.R. Validation de la technique multi-PRINS dans la detection des chromosomes 18, X et Y sur des amniocytes en preparation directe.

Orale, 20^{ème} Réunion annuelle de l'Association de Cytogénétique du Québec (Avril 25, 2003), Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec, Canada.