

Université de Sherbrooke

Étude préliminaire de la longueur individuelle des télomères et des anomalies chromosomiques dans les glioblastomes

Par
Brigitte Bélanger
Programme de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Mars 2013

Membres du jury d'évaluation
Pr David Fortin, Département de chirurgie, Université de Sherbrooke
Pr Régen Drouin, Département de pédiatrie, Université de Sherbrooke
Pr Jean-Bernard Denault, Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke
Pre Nada Jabado, Département de pédiatrie, Université McGill

© Brigitte Bélanger, 2013



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: 978-0-499-00346-1

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-499-00346-1

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.

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.

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.

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

*Je dédie cet ouvrage à ma famille,
Fernand, Ginette, Philippe, Catherine, Sébastien,
Léanne et Sara-Maude,
à mes collègues et mes amis,
qui ont su m'accompagner et m'encourager
dans mes projets, dans mes bonheurs et mes peines.*

*La plus grande gloire n'est pas de ne jamais tomber,
mais de nous relever à chaque fois...*

-Confucius

RÉSUMÉ

Étude préliminaire de la longueur individuelle des télomères et des anomalies chromosomiques dans les glioblastomes

Par

Brigitte Bélanger

Programme de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Le glioblastome (GBM) est une tumeur cérébrale maligne de grade IV dont le pronostic est de 14,6 mois avec le traitement standard. Le pronostic des patients est difficile à préciser et de meilleures connaissances de l'évolution de ce cancer nous permettraient d'identifier de nouveaux marqueurs permettant d'estimer plus précisément le stade du cancer et ainsi, la survie des patients. L'équipe du Dr Ju Yan a étudié les profils de longueurs individuelles des télomères des cellules de patients normaux et de patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) avec les techniques d'analyse des fragments terminaux de restriction des télomères (TRF) et d'hybridation *in situ* observée en fluorescence de façon quantitative (Q-FISH). En utilisant les mêmes protocoles sur les GBM, nous avons évalué les longueurs individuelles des télomères et leurs profils. L'analyse complète de onze spécimens de GBM humains et de la lignée cellulaire de glioblastome U-87 MG nous a permis d'observer que les télomères 12p, 16p, 22q, 17p, 17q, 19p et 22q sont maintenus plus longs dans les profils de longueurs individuelles relatives. En comparant avec les données du Dr Yan, nous avons pu déterminer que les télomères 21p et 2q sont fréquemment observés parmi les télomères les plus courts dans les GBM et dans la LMC. Les comparaisons des télomères significativement plus courts à ceux plus longs nous ont permis d'identifier l'allongement des télomères 12p, 16p et 20q de même que le raccourcissement des télomères 3q, 9p et 22q comme étant des événements potentiellement spécifiques à l'évolution des GBM. Les télomères 12q et 22q ont été observés parmi les télomères les plus courts et parmi les plus longs dans différents cas de GBM et de LMC, suggérant que le maintien de la longueur et le raccourcissement de ces extrémités peuvent jouer un rôle dans l'évolution du cancer. L'utilisation du FISH multicolore (M-FISH) nous a permis d'identifier les chromosomes impliqués de façon récurrente parmi les anomalies de nombre et de structure. Nous avons noté les délétions des chromosomes 1, 2, et 20 ainsi que des segments des chromosomes 6, 11q, 13q, 14q et 18. Au niveau des duplications, on retrouve majoritairement le bras court du chromosome 4 et un segment du chromosome 7. Nous avons aussi observé dans nos analyses que les chromosomes 1, 6, 12, 13, 22 et 14 sont particulièrement impliqués dans les réarrangements et leurs télomères sont fréquemment retrouvés dans les plus courts (1p, 1q, 13p, 22p et 6p). Globalement, nous avons observés que les tumeurs décrites comme étant agressives sont associées avec une survie courte après diagnostic et elles présentent des télomères courts et/ou plusieurs anomalies chromosomiques. Les tumeurs décrites comme étant indolentes sont associées avec une survie longue après diagnostic et elles présentent des télomères souvent de longueur normale et un nombre inférieur d'anomalies chromosomiques comparativement aux tumeurs agressives.

Mots clés : Longueur individuelle, télomère, anomalie chromosomique, gliome, glioblastome, GBM, instabilité génomique, évolution tumorale.

SUMMARY

Preliminary study of the individual telomere length and chromosome anomalies in glioblastomas

By

Brigitte Bélanger

Pharmacology program

Thesis presented to the Faculty of Medicine and Health Sciences for the Master Degree Diploma (Maître ès Sciences (M.Sc.)) in Pharmacology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Glioblastoma (GBM) is a grade IV astrocytoma, a brain cancer whose prognosis is only 14.6 months with standard care. Patient prognosis is still hard to detail and a better understanding of the disease might allow us to identify new markers of the evolution and survival. Dr. Ju Yan and his team studied profiles of individual telomere length in normal blood cells and chronic myeloid leukemia (CML). They used different techniques such as terminal restriction fragments of the telomeres (TRF) and quantitative fluorescence *in situ* hybridization (Q-FISH). In their studies, they identified few telomeres which length is preferentially maintained or elongated depending on disease stage of CML. Using the same protocols and comparing GBM telomere length profiles with those obtained with normal and CML cells, we recognised events already identified but also new potential actors in the evolution process of GBM. The complete analysis of eleven specimens of GBM and the glioblastoma cell line U-87 MG allowed us to observe that the telomeres 12p, 16p, 22q, 17p, 17q, 19p and 22q are maintained long in the global profiles of telomere length. Comparing these results with those obtained with blood cells and CML, we determined that 21p and 2q are frequently shortened in GBM and LMC, suggesting that they are cancerogenesis events. We were able to identify the elongation of the 12p, 16p and 20q as well as the shortening of the 3q, 9p and 22p as potential events exclusive to GBM. We observed length variation within the cases for the 12q and 22q extremities. These telomeres were observed in the longest as well as in the shortest for different tumors, suggesting their role in the evolution of GBM. The karyotyping of all cells analysed was made using the Multicolor FISH (M-FISH) technique. We identified chromosomes that are recurrently implicated in structural and number aberrations. We observed deletion of whole chromosomes 1, 2 and 20 as well as segments of chromosomes 6, 11q, 13q, 14q, and 18. We also found amplification of the short arm of chromosome 4 and a partial trisomy of chromosome 7. Most of these observations have already been reported in the literature. Chromosomes 1, 6, 12, 13, 22 and 14 were particularly implicated in chromosomal translocations and most of those chromosomes showed short telomeres (1p, 1q, 13p, 22p and 6p). We observed globally in our specimens that patient with aggressive tumors showed shorter telomeres and/or many chromosomal aberrations. Patients with indolent tumors had longer survival after diagnosis, telomere length was normal and the number of aberrations was lower than observed in aggressive tumors. The study of a larger population of GBM sample would allow us to confirm our observations and to identify new characteristic events of tumor development.

Keywords: Individual telomere length, telomere, chromosome anomalies, glioma, glioblastoma GBM, genomic instability.

TABLE DES MATIERES

Résumé	iv
Summary	v
Table des matières	vi
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations	xii
Introduction	1
1.1 Le système nerveux central et le cerveau	1
1.1.1 Les tumeurs cérébrales.....	1
1.1.2 Les gliomes.....	2
1.1.3 Le glioblastome (GBM).....	4
1.1.4 Marqueurs moléculaires dans les gliomes.....	6
1.1.4.1 Marqueurs moléculaires dans les glioblastomes.....	6
1.2 Télomères : structure, fonction et régulation	8
1.3 Longueur des télomères	9
1.3.1 Raccourcissement des télomères et sénescence.....	10
1.3.2 Télomères dans les cellules du cerveau.....	11
1.3.3 Longueur individuelle des télomères.....	12
1.3.4 Méthode de mesure de la longueur des télomères.....	13
1.3.5 Patrons de longueurs relatives individuelles.....	15
1.3.6 Instabilité des télomères.....	16
1.3.7 Longueur des télomères dans le cancer.....	17
1.3.8 Mécanismes de maintien des télomères.....	18
1.3.8.1 Réactivation de la télomérase.....	19
1.3.8.2 Allongement alternatif des télomères.....	19
1.4 Caractéristiques moléculaires et chromosomiques des GBM	20
1.4.1 Anomalies de nombre et de structure.....	22
1.4.2 Modification de l'information génétique : mutations.....	24
1.4.3 Les glioblastomes pédiatriques.....	26
1.5 Objectifs et questions de travail	27
Matériel et méthodes	29
2.1 Sélection des tumeurs	29

2.2 Culture primaire de cellules gliales	29
2.3 Congélation des cellules	30
2.4 Préparation de culot de cellules	30
2.5 Récolte de cellules adhérentes	30
2.6 Extraction d'ADN	31
2.7 Analyse de la longueur moyenne des télomères	31
2.8 PNA FISH (Q-FISH)	33
2.9 Hybridation in situ multicolore observée en fluorescence (M-FISH)	33
2.10 Prise de photo, caryotypage et mesures des longueurs des télomères	34
2.11 Analyses statistiques des mesures individuelles des télomères	35
Résultats	36
3.1 Traitement des spécimens de la chirurgie aux analyses	36
3.2 Longueur moyenne des télomères	37
3.3 Caryotypage des spécimens	39
3.4 Description des résultats individuels	41
3.4.1 Spécimen U87-MG.....	41
3.4.2 Spécimen 1	43
3.4.3 Spécimen 2	43
3.4.4 Spécimen 3	44
3.4.5 Spécimen 4	45
3.4.6 Spécimen 5	46
3.4.7 Spécimen 6	46
3.4.8 Spécimen 7	48
3.4.9 Spécimen 8	49
3.4.10 Spécimen 9	50
3.4.11 Spécimen 10.....	50
3.4.12 Spécimen 11.....	51
3.5 Télomères significativement différents dans les GBM	53
Discussion	57
4.1 Spécimens observés	57
4.1.1 Spécimens cliniques	57
4.1.2 Lignées contrôle.....	58
4.1.2.1 Contrôle positif.....	58
4.1.2.2 Contrôle négatif.....	59

4.2 Longueur des télomères.....	61
4.2.1 Raccourcissement de la longueur moyenne.....	62
4.2.2 Différentes « populations télomériques »	63
4.2.3 Comparaison de la longueur moyenne avec la survie des patients.....	64
4.2.4 Des bandes de longueurs spécifiques	65
4.3 Télomères les plus courts et les plus longs	66
4.3.1 Analyse des profils des télomères.....	69
4.4 Anomalies chromosomiques	69
4.4.1 Sommaire.....	70
4.5 Conclusion	71
4.6 Perspectives	73
Remerciements	75
Annexes	76
6.1 Annexe 1.	76
6.2 Annexe 2.	77
6.3 Annexe 3.	79
6.4 Annexe 4.	88
Liste de références	91

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Distribution des tumeurs primaires du cerveau et du système nerveux central en Amérique du Nord.	2
Figure 2. Distribution des gliomes primaires du cerveau et du système nerveux central par sous-types histologiques.	4
Figure 3. Classification des glioblastomes primaires et secondaires.	5
Figure 4. Configuration structurale d'un télomère.	9
Figure 5. Ségrégation des chromosomes selon les phases du cycle cellulaire.....	13
Figure 6. Longueurs relatives associées aux échantillons sanguins normaux.	16
Figure 7. Formation de BBF suite à l'érosion des télomères.....	17
Figure 8. Longueurs relatives associées aux échantillons de LMC.	18
Figure 9. Voies de signalisations majoritairement impliquées dans les GBM.....	21
Figure 10. Anomalies de structure dans l'initiation ou la progression du cancer.....	22
Figure 11. Sommaire des variations du nombre de copies de spécimens de GBM.....	23
Figure 12. Montage de type <i>Southern</i> utilisé pour la technique TRF.....	32
Figure 13. Schéma général des manipulations effectuées à partir des spécimens tumoraux.	36
Figure 14. Analyse TRF pour chacun des spécimens.	38
Figure 15. Exemple de caryotype particulier observé par M-FISH et Q-FISH.....	40
Figure 16. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères de la lignée cellulaire U87-MG.....	42
Figure 17. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 1.....	43
Figure 18. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 2.....	44
Figure 19. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 3.....	44
Figure 20. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 4.....	45
Figure 21. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 5.....	46
Figure 23. Caryotype de la cellule 1 du spécimen 6 représentant la complexité des caryotypes retrouvés.	48
Figure 24. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 7.....	49
Figure 25. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 8.....	49

Figure 26. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 9.....	50
Figure 26. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 10.....	51
Figure 27. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 11.....	52
Figure 28. Caryotype en Q-FISH d'une cellule du spécimen 11.....	52
Figure 29. Analyse des astrocytes humains comme contrôle négatif.....	60
Figure 30. Longueur moyenne des télomères en fonction de la survie après chirurgie des spécimens cliniques analysés.....	64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Système de classification des tumeurs gliales selon l'OMS.....	3
Tableau 2. Comparaison des techniques de mesure de la longueur des télomères.....	14
Tableau 3. Gènes identifiés dans les altérations du nombre de copies fréquentes dans les GBM	25
Tableau 4. Gènes fréquemment mutés dans les GBM.....	26
Tableau 5. Longueurs moyennes des télomères obtenus suite à l'analyse TRF.....	39
Tableau 6. Nombre de chromosomes et d'anomalies de structure retrouvé par mitose	40
Tableau 7. Télomères considérés comme significativement différents de la moyenne	53
Tableau 8. Variations entre les télomères les plus courts et les plus longs	54

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Akt	Protéine kinase B (PKB), <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
ALT	Allongement alternatif des télomères, <i>Alternative lengthening of telomeres</i>
ANXA7	Annexine A7, <i>Annexin A7</i>
APB	Corps leucémique promyélocytaire associé à l'allongement alternatif des télomères, <i>associated promyelocytic leukaemia (PML) bodies</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATRX	<i>Apha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked</i>
BBF	Cycles de cassure-pont-fusion, <i>Breakage-Bridge-Fusion</i>
CDK4	Kinase dépendante de la cycline 4, <i>Cyclin-dependant kinase 4</i>
CDKN2A	Inhibiteur de kinase dépendante de la cycline 2A - <i>Cyclin-dependant kinase inhibitor 2A</i> (voir p16 ^{INKa4})
CDKN2B	Inhibiteur de kinase dépendante de la cycline 2B - <i>Cyclin-dependant kinase inhibitor 2B</i>
CGH	Hybridation génomique comparative, <i>Comparative genomic hybridization</i>
CHUS	Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke
CIC	Homologue de <i>Drosophila capicua</i>
CSPD	CSPD [®] <i>Chemiluminescent Substrate for Alkaline Phosphatase</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole, <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DAXX	<i>Death-domain associated protein</i>
DIG	Digoxygénine
DMEM	Milieu de culture cellulaire DMEM, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique, <i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERBB2	Oncogène ERBB2, <i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)</i>
FAS	Fragment inducteur d'apoptose, <i>Apoptosis Stimulating Fragment</i>
FBS	Sérum fœtal bovin, <i>Foetal Bovine Serum</i>

FISH	Hybridation <i>in situ</i> observée en fluorescence, <i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FUBP1	<i>Far-upstream binding protein 1</i>
G0	Période G0 du cycle cellulaire
GBM	Glioblastome, <i>Glioblastoma</i>
HBSS	Solution saline tamponnée de Hank's, <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Acide chlorhydrique
IDH1	Isocitrate déshydrogénase 1, <i>Isocitrate dehydrogenase 1</i> (NADP+)
KIT	<i>V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
KDR	<i>Kinase insert domain receptor</i>
LMC	Leucémie myéloïde chronique
LOH	Perte d'hétérozigocité, <i>Loss of heterozygosity</i>
MET	Proto-oncogène met, <i>met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)</i>
M-FISH	Hybridation <i>in situ</i> multicolore observée en fluorescence, <i>Multicolor Fluorescence in situ hybridization</i>
MGMT	O ⁶ -méthylguanine- méthyltransferase
miRNA	Micro-ARN, <i>micro RNA</i>
mTOR	Cible mécanistique de la rapamycine sur la sérine et la thréonine chez les mammifères, <i>Mammalian mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)</i>
MYC	Proto-oncogène myélocytomateux MYC, <i>Myelocytomatosis proto-oncogene</i>
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NaOH	Hydroxyde de sodium
NF1	Neurofibromine 1, <i>neurofibromin 1</i>
NHEJ	Liaison non-homologue des extrémités, <i>Non-Homologous end-joining</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
p	Bras court des chromosomes
p16 ^{INK4a}	Kinase inhibitrice 2A qui dépend de la cycline, <i>Cyclin-dependant kinase inhibitor 2A (CDKN2A), Multiple tumor suppressor1 (MTS-1)</i>

PDGFRA	Récepteur alpha du facteur de croissance dérivé des plaquettes, <i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha</i>
PIK3CA	Kinase 3 phosphatidylinositol-4,5-biphosphonate, sous-unité catalytique alpha, <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha</i>
PIK3R1	Kinase 3 phosphoinositide, sous-unité régulatrice alpha, <i>Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>
PML	Leucémie promyélocytaire, <i>promyelocytic leukaemia (PML)</i>
PNA	Peptide d'acide nucléique, <i>nucleic acid peptide</i>
POT1	Homologue 1 de la protection des télomères, <i>protection of telomeres 1</i>
PPD	p-Phénylènediamine
PTEN	Gène suppresseur de tumeur PTEN homologue de la phosphatase tensine, <i>Phostatase and TENSin homolog mutated in multiple advanced cancers 1</i>
PTPRD	Récepteur de la protéine tyrosine phosphatase de type D, <i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type D</i>
q	Bras long des chromosomes
Q-FISH	Hybridation <i>in situ</i> observée en fluorescence de façon quantitative, <i>Quantitative fluorescence in situ hybridization</i>
RAP1	Protéine interagissant avec le facteur 2 de liaison aux répétitions télomériques
RB1	Gène codant pour la protéine associée au rétinoblastome, <i>Retinoblastoma-associated protein gene</i>
SNP	Polymorphisme d'un seul nucléotide, <i>Single nucleotide polymorphism</i>
SSC	Solution de saline sodium citrate
TBS	Solution saline tamponnée au Tris, <i>Tris-buffered saline</i>
TERC	Composante en ARN de la télomérase, <i>telomerase RNA component</i>
TERT	Trancryptase inverse de la télomérase, <i>telomerase reverse transcriptase</i>
TIMP3	Inhibiteur de métalloprotéinase 3, <i>Metalloproteinase inhibitor 3</i>
TIN2	Facteur 2 d'interaction nucléaire de TRF1
TP53	Gène de la protéine p53, <i>Tumor protein p53</i>
TRF	Méthode de mesure des fragments de restriction terminaux reliés aux répétitions de séquences télomériques, <i>Terminal restriction fragment</i>

TRF1	Facteur 1 de liaison aux répétitions télomériques, <i>telomeric repeat-binding factor 1</i>
TRF2	Facteur 2 de liaison aux répétitions télomériques, <i>telomeric repeat-binding factor 2</i>
TPP1	Facteur 1 de processivité de la télomérase, <i>telomerase processivity protein 1</i>
Tris-HCl	2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol – Chlorure d’hydrogène
UVC	Rayon ultraviolet de type C
VEGF	Facteur de croissance de l’endothélium vasculaire, <i>Vascular endothelial growth factor</i>

INTRODUCTION

1.1 Le système nerveux central et le cerveau

Le système nerveux central est formé de l'encéphale et de la moelle épinière. Les tissus nerveux, glial et vasculaire permettent l'interprétation des signaux sensitifs provenant des nerfs et émettent des réponses motrices en retour. L'encéphale est composé du cerveau, du tronc cérébral, du cervelet et du diencephale (thalamus et hypothalamus) (Les éditions Québec Amérique Inc. 2010; Marieb EN. 1999)

La matière blanche et la matière grise forment la structure interne et externe du cerveau. Le prolongement des neurones, ou axones, et les cellules gliales composent l'essentiel de la matière blanche tandis que la matière grise contient principalement des corps neuronaux (soma) (Nakamura et coll. 2007). Les cellules gliales jouent le rôle de soutien et de protection des neurones. Ces cellules apportent tous les nutriments et permettent le maintien de l'homéostasie chimique et électrique des neurones. Bien que le ratio exact soit encore inconnu, la substance blanche contiendrait de 5 à 50 fois plus de cellules gliales que de neurones (Azevedo et coll. 2009; Nedergaard et coll. 2003). On retrouve différents types de cellules gliales dont les astrocytes, les oligodendrocytes, les épendymocytes et les microglies. Différents types de cancer peuvent prendre forme à partir de ces cellules.

1.1.1 Les tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales se développent à partir de cellules transformées devenues anormales. Ces cellules continuent à se diviser et à progresser à l'intérieur du parenchyme cérébral, tout en accumulant des changements génétiques. Les statistiques de la Société Canadienne du Cancer indiquent que 2 800 nouveaux cas de cancer de l'encéphale ont été déclarés en 2012, représentant 1,8% des nouveaux cas de cancer au Canada. Le nombre de décès annuel pour cette même année a été établi à 1 850, représentant une très grande proportion de mortalité par rapport aux nouveaux cas diagnostiqués.

Les tumeurs primaires du cerveau proviennent, pour la plupart, des méninges (méningiomes) ou des cellules gliales (gliomes). En Amérique du Nord, selon le *Central Brain Tumor Registry of the United States* (CBTRUS), les gliomes comptent pour 29% de la totalité des tumeurs du cerveau et du système nerveux central (SNC) (Figure 1), et représentent 80% des tumeurs malignes (Dolecek et coll. 2012). Les gliomes incluent dans la figure 1 les glioblastomes, les astrocytomes, les tumeurs épendymaires, les oligodendrogliomes et d'autres tumeurs non spécifiées (Dolecek et coll. 2012).

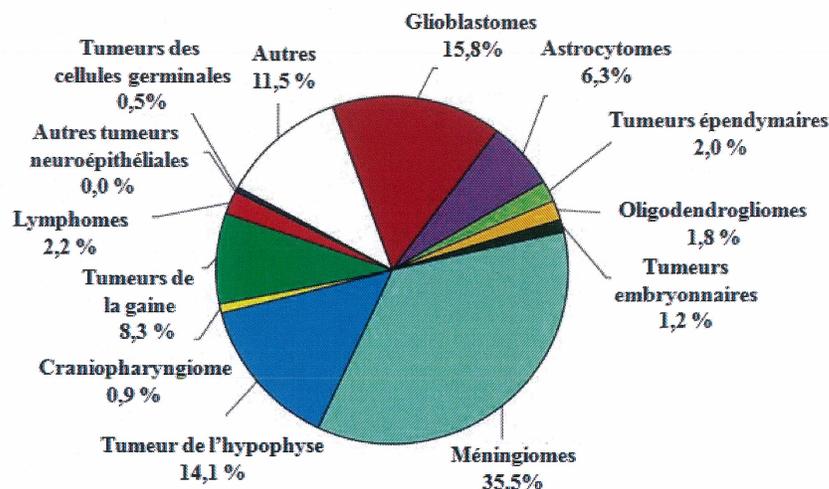


Figure 1. Distribution des tumeurs primaires du cerveau et du système nerveux central en Amérique du Nord, par sous-types histologiques. Figure modifiée du rapport statistique du CBTRUS 2005-2009 (Dolecek et coll. 2012).

1.1.2 Les gliomes

La catégorisation histologique des tumeurs est faite selon les critères de la nouvelle classification des tumeurs du système nerveux central de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Fritz 2008; Louis et coll. 2007). Les gliomes peuvent être classifiés en différents grades selon les critères pathologiques. Les principaux sont les astrocytomes pilocytiques (grade I), les astrocytomes fibrillaires diffus de bas grade (II), les oligodendrogliomes de bas grade (II), les astrocytomes et oligodendrogliomes anaplasiques (grade III) et les glioblastomes (autrefois appelés glioblastomes multiformes) ou GBM (grade IV) (tableau 1).

Tableau 1. Système de classification des tumeurs gliales selon l’OMS. (Fritz 2008).

Type de tumeurs	Grade OMS
Tumeurs astrocytaires (Astrocytomes)	
Sous-épendymaire à cellules géantes	I
Pilocytiques	I
De bas grade	II
Xanthoastrocytomes pléomorphes	II-III
Anaplasiques	III
Glioblastome	IV
Oligodendrogliomes	
De bas grade	II
Anaplasique	III
Oligoastrocytomes	
De bas grade	II
Anaplasiques	III
Tumeurs épendymaires (épendymomes)	
Astrocytome sous-épendymaire	I
Myxopapillaires	I
De bas grade	II
Anaplasiques	III
Tumeurs neuronales/gliales	
Gangliocytomes	I
Gangliomes	I-II
Ganglioneuromes anaplasiques	III
Ganglioneuromes desmoplastiques infantiles	I
Tumeurs neuroépithéliales dysembryoplasiques	I
Neurocytomes centraux	I

Les astrocytomes sont des tumeurs ayant pour origine le cerveau ou la moelle épinière. L’incidence des astrocytomes et des oligodendrogliomes augmente avec l’âge. Ces types de cancers sont donc retrouvés plus fréquemment chez les adultes. L’âge médian du diagnostic est d’environ 60 ans pour le cancer du cerveau (Dolecek et coll. 2012). Les astrocytomes et les glioblastomes totalisent 76% de tous les gliomes (figure 2) (Dolecek et coll. 2012). L’identification des sous-types permet d’orienter le pronostic et les traitements offerts aux patients (Louis et coll. 2007). Le GBM (grade IV) est la tumeur la plus agressive et représente 54% des gliomes (figure 2).

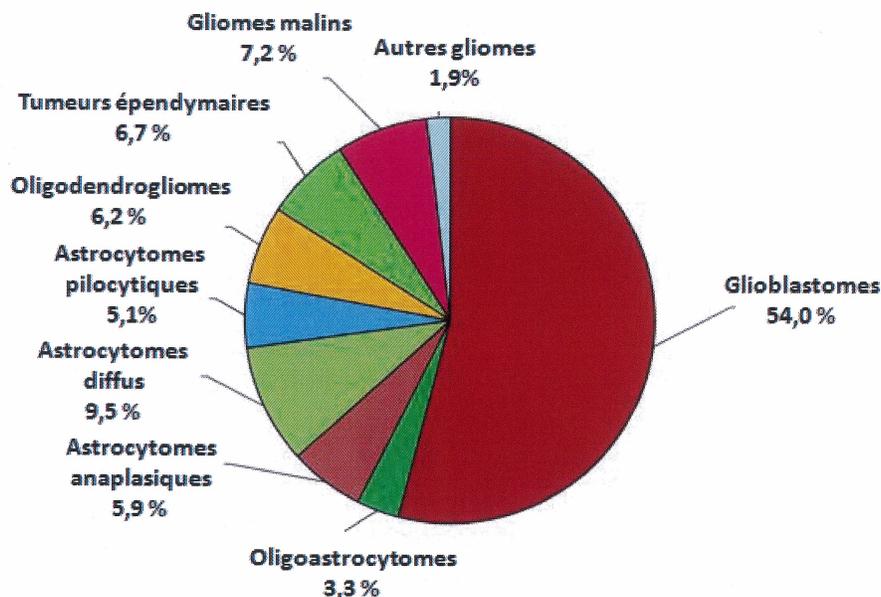


Figure 2. Distribution des gliomes primaires du cerveau et du système nerveux central par sous-types histologiques. Figure modifiée du rapport statistique du CBTRUS 2005-2009 (Dolecek et coll. 2012).

1.1.3 Le glioblastome (GBM)

Le GBM est la tumeur gliale la plus fréquente et la plus mortelle des gliomes. Il représente 15,8% de toutes les tumeurs primaires du cerveau. Ce cancer reste rare en Amérique du Nord avec une incidence de 3,19 par 100 000 habitants en date de 2009 (Dolecek et coll. 2012). Les hommes en sont 1,6 fois plus atteints que les femmes et les Caucasiens le sont 2 fois plus que les Noirs (Dolecek et coll. 2012). La survie médiane des patients est de 14,6 mois avec le traitement standard, c'est-à-dire, la chirurgie suivie d'une combinaison de radiothérapie et de chimiothérapie (témolozomide) administré en concomitance (Stupp et coll. 2005). Malgré les avancées scientifiques faites dans les dernières décennies, le taux de survie est estimé à 37% pour un an et 4,7% après 5 ans (Dolecek et coll. 2012). L'évaluation du pronostic est très difficile due à la grande hétérogénéité tumorale retrouvée entre les patients.

Les cellules de GBM sont caractérisées par une progression rapide et par une forte migration à l'intérieur du parenchyme cérébral, complexifiant la tâche lors de la résection chirurgicale de la masse tumorale et augmentant les chances de récurrences du cancer. Le

GBM est très hétérogène et indifférencié au niveau cellulaire ainsi que dans l'expression génique. Le centre tumoral des GBM présente de la nécrose dans 85% des cas (Dahlback et coll. 2009).

Le GBM peut être primaire ou secondaire. La tumeur primaire est formée *de novo*, sans caractéristique moléculaire permettant de reconnaître l'évolution à partir un astrocytome ou d'un oligodendrogliome de grade III (figure 3). L'évolution à partir d'une tumeur astrocytaire de grade inférieur est caractéristique du GBM secondaire et décrit dans 10 à 12 % des cas (Bleeker et coll. 2012; Ohgaki and Kleihues 2013; Sanson et coll. 2009).

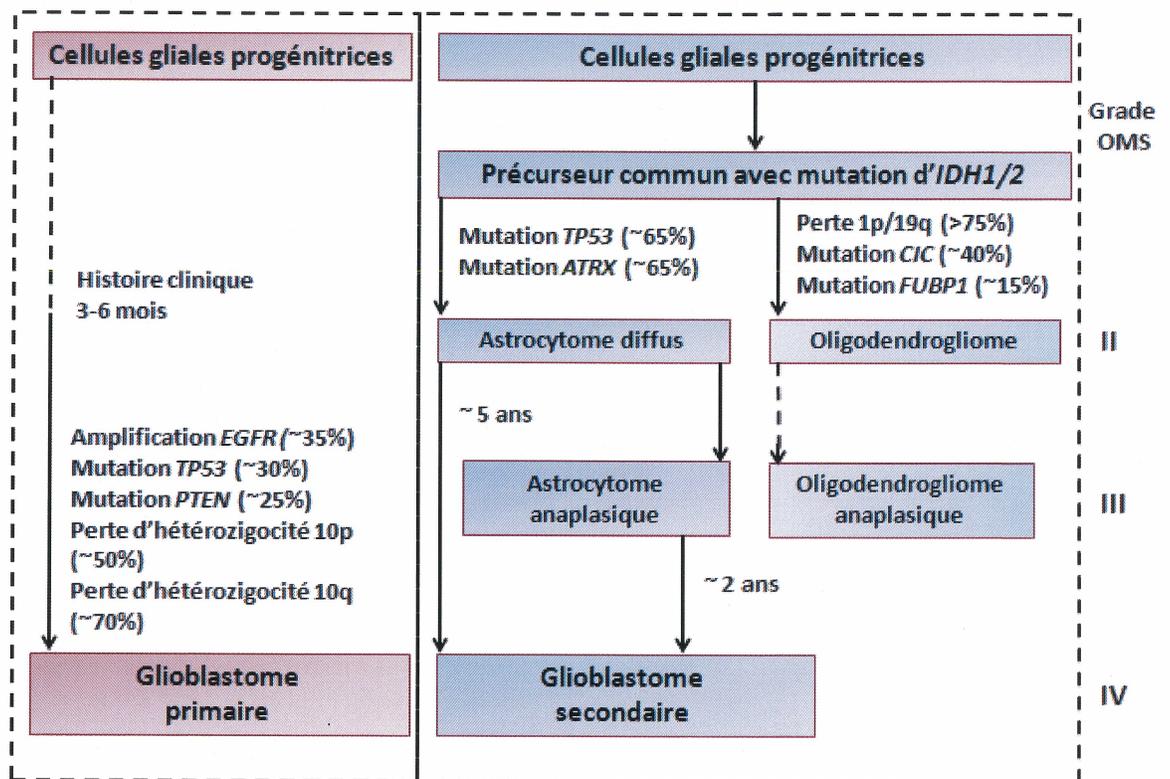


Figure 3. Classification des glioblastomes primaires et secondaires. Figure modifiée (Ohgaki and Kleihues 2013).

Le glioblastome pédiatrique possède des caractéristiques différentes que celles retrouvées chez l'adulte par le nombre de copie d'ADN (*DNA copie number*) et par l'expression des gènes ((Qu et coll. 2010; Schwartzentruber et coll. 2012)). Cette étude porte strictement sur les glioblastomes adultes.

1.1.4 Marqueurs moléculaires dans les gliomes

Les marqueurs moléculaires permettent d'évaluer certains facteurs pronostics et prédictifs. Par exemple, en clinique, la prolifération cellulaire est mesurée par immunohistochimie avec l'anticorps monoclonal Ki-67 sur chacune des biopsies tumorales. Cet anticorps réagit avec la protéine nucléaire Ki-67 exprimée dans toutes les phases actives du cycle cellulaire, sauf en G₀, stade quiescent de non-division (Burger et coll. 1986). Ce marqueur identifie les cellules en réplication. Le pourcentage de cellules colorées indique l'indice de prolifération Ki-67 (Fisher et coll. 2002). Un indice élevé dans le GBM correspond à une prolifération cellulaire intense et à une probabilité plus élevée d'une récurrence rapide du cancer (Jin et coll. 2011; Schroder et coll. 2002).

Le caractère évolutif des tumeurs cérébrales est causé par une très grande hétérogénéité au niveau des caractéristiques moléculaires de chaque tumeur. Beaucoup d'efforts sont déployés afin d'identifier de nouveaux marqueurs permettant une meilleure validité du pronostic, de la réponse thérapeutique ou l'identification de nouvelles caractéristiques pathognomoniques des cellules cancéreuses, c'est-à-dire unique à la maladie.

Des marqueurs utilisés dans les gliomes, on peut noter l'identification de la délétion ou de la perte d'hétérozygoté des bras chromosomiques 1p et 19q reliée au diagnostic des oligodendrogliomes. Ce marqueur contribue au diagnostic histopathologique et permet de prévoir une meilleure réponse au traitement de chimiothérapie avec témozolomide (Arslantas et coll. 2007; Gadji et coll. 2009a).

1.1.4.1 Marqueurs moléculaires dans les glioblastomes

Plusieurs études ont mis en évidence des caractéristiques intéressantes pouvant servir de marqueurs au niveau des GBM. Les nouvelles techniques d'analyse du génome ont permis d'identifier des mutations dans les gènes de l'isocitrate déshydrogénase (IDH1), codant pour un enzyme oxydoréductase localisé dans le cytoplasme et dans les peroxysomes (Sanson et coll. 2009). Cette enzyme sert à la production majeure de NADPH cytosolique servant à la régénération du glutathion, un antioxydant important dans les cellules. Cette mutation est considérée comme un événement précurseur des GBM secondaires et, malgré son implication dans le cancer, semble supposer une survie

à plus long terme des patients (Ohgaki and Kleihues 2013; Sanson et coll. 2009; Yan et coll. 2009). Les signatures des mutations des gènes IDH1/CIC/FUBP1 et IDH1/ATRX est considéré aussi comme étant facteur de bon pronostic dans les GBM secondaires (section 1.3.7) (Liu et coll. 2012)(Horbinski 2013; Jiao et coll. 2012; McDonald et coll. 2010; Ohgaki and Kleihues 2013; Royds et coll. 2011). Concernant les GBM primaires, les mutations dans le promoteur du gène TERT (*telomerase reverse transcriptase*) ont été retrouvées dans plus de 80% des cas (Killela et coll. 2013). De plus les mutations du gène ATRX et TERT ont été identifiées comme mutuellement exclusives dans les tumeurs primaires, donnant un avantage prolifératif sur les cellules gliales ayant normalement une très faible croissance cellulaire (Killela et coll. 2013). Ces évènements sont aussi souvent associés avec l'amplification du gène EGFR (Killela et coll. 2013). Les GBM primaires sans mutation de TERT ont un meilleur pronostic (Killela et coll. 2013).

L'identification des différences génétiques (signatures génétiques) entre les GBM primaires (PTEN, TP53, EGFR et secondaires (IDH1/2, CIC, ATRX, FUBP1) pourrait éventuellement influencer le pronostic et les traitements des patients (Jiao et coll. 2012; Ohgaki and Kleihues 2013). Parallèlement, le changement du statut de méthylation du promoteur ou la mutation du gène de l'enzyme de réparation O⁶-méthylguanine-méthyltransférase (MGMT) ont été identifiés comme étant des marqueurs moléculaires prédictifs positifs dans la réponse au traitement chimiothérapeutique dans les GBM (Bleeker et coll. 2012; Hassler et coll. 2006; Salvo et coll. 2011). La présence de la mutation d'IDH1/2 et de la méthylation de MGMT indique aussi une prédiction d'une meilleure survie du patient (Leu et coll. 2013). De la modification du gène découle l'absence ou l'inactivation de l'enzyme de réparation de l'ADN qui, normalement, agit en réponse aux lésions causées par les agents alkylants tels que le témolozomide (Salvo et coll. 2011).

L'étude de l'architecture nucléaire des télomères (section 1.3.4) dans les GBM a identifié la présence de différents niveaux de désordre télomérique associés à 3 classes de survie des patients : survie à court terme, survie de durée intermédiaire et survie à long terme (Gadji et coll. 2010). Cette étude a montré une corrélation inverse entre le désordre des télomères dans le noyau et la survie des patients.

Plusieurs autres anomalies génétiques sont déjà documentées pour les GBM (section 1.4) et les recherches se poursuivent afin de trouver de nouveaux marqueurs moléculaires permettant d'évaluer le pronostic du patient et la réponse aux traitements. L'intérêt de l'étude des télomères dans le cancer semble grandissant afin de comprendre davantage les mécanismes régissant ces structures.

1.2 Télomères : structure, fonction et régulation

Les télomères sont des répétitions d'hexanucléotides (5'-TTAGGG-3')_n bicaténaires servant à la stabilité et à la protection de la dégénérescence, de la recombinaison, de la fusion et de la perte du matériel génétique (Blackburn 1991). Les télomères mesurent entre 5 et 15 kb à chaque extrémité des 23 paires de chromosomes contenus dans chaque cellule humaine (Samassekou et coll. 2010).

La double hélice d'ADN est composée de 2 brins complémentaires. Au niveau des télomères, un de ces brins est riche en guanine (G) et l'autre en cytosine (C). L'extrémité du brin d'ADN riche en G est saillante en 3', ce qui permet de prévenir la reconnaissance de l'ADN comme étant une cassure bicaténaire. Le repliement de cette extrémité permet la formation d'une boucle T (*T loop*) permettant à l'extrémité monocaténaire de se positionner à l'intérieur de la boucle d'ADN (figure 4). Le point d'insertion de l'extrémité saillante du brin riche en G est la boucle D (*D-loop*) (Novo and Londono-Vallejo 2012). Cette structure en boucle permet le « *capping* » des extrémités des brins d'ADN.

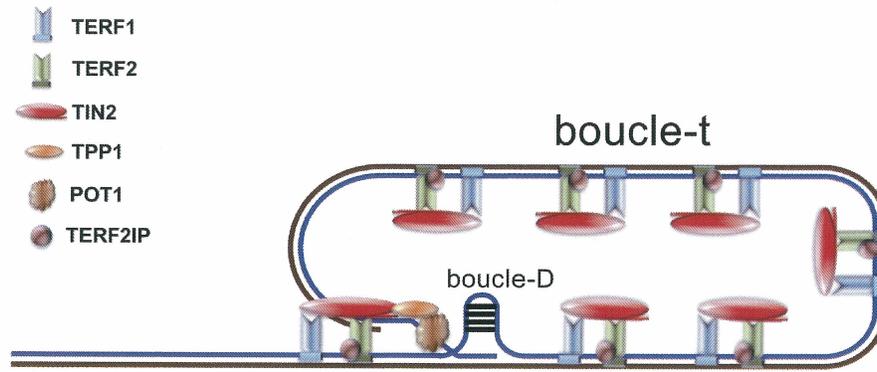


Figure 4. Configuration structurale d'un télomère. Tirée de la thèse du Dr Oumar Samassekou (Samassekou and Université de Sherbrooke 2011), page 12.

Plusieurs protéines sont liées aux répétitions TTAGGG et forment ainsi un complexe de protection stable et régulé nommé complexe de shelterin. Ce complexe est formé des protéines TRF1 (aussi appelée TERF1), TRF2 (aussi appelée TERF1), RAP1 (aussi appelée TERF2IP), TIN2, TPP1 (aussi appelée PTP/PIP1/TINT1) et POT1, toutes importantes pour la stabilité des télomères et aussi dans la prévention de la reconnaissance de l'extrémité du double brin d'ADN comme une cassure (Gomez et coll. 2012; Samassekou and Université de Sherbrooke 2011). Cette structure régule parallèlement l'accès de la télomérase, l'enzyme ayant la capacité d'allonger les télomères (section 1.3.7).

À chaque réplication cellulaire, les télomères subissent une perte d'environ 50 à 100 paires de bases. Cette dégradation est causée par le mécanisme de réplication de l'extrémité saillante en 3' par l'ADN polymérase. Des problèmes liés à la réplication du brin riche en C et le stress oxydatif présent dans la cellule peuvent favoriser un raccourcissement plus rapide des télomères (Gilson and Londono-Vallejo 2007; Graakjaer et coll. 2006; Martin et coll. 1999). La longueur des télomères a un impact important sur la stabilité du brin d'ADN et, du fait même, du chromosome.

1.3 Longueur des télomères

La longueur des télomères est, par définition, un équilibre dynamique entre l'élongation et le raccourcissement des répétitions télomériques. Cette longueur est maintenue par l'enzyme télomérase dans les cellules germinales mais n'est pas active

dans les cellules somatiques du corps humain. Les cellules somatiques, ayant au départ des télomères entre 5 et 15 kb et perdant entre 50 et 100 pb à chaque réplication, entrent en sénescence lorsque la longueur limite critique est atteinte (Allsopp 1996; Shay and Wright 2005).

1.3.1 Raccourcissement des télomères et sénescence

En 1961, le Dr Hayflick identifia la limite du nombre maximum de divisions cellulaires possibles pour des fibroblastes humains en culture (Hayflick and Moorhead 1961). Il a alors été établi que lorsque la limite de division est atteinte, la cellule entre dans un état de vieillissement nommé sénescence (Allsopp et coll. 1992). Cette limite répllicative a pu être reliée quelques années plus tard au raccourcissement maximal de la longueur des télomères (Allsopp et coll. 1992). La limite de Hayflick correspond au nombre maximal de divisions que peut atteindre une cellule mitotique avant son entrée en sénescence et, éventuellement, à la mort cellulaire. Le lien entre le nombre de réplifications et la longueur des télomères a été établi dans les années 1990 (Allsopp et coll. 1992). La perte moyenne des télomères dans les fibroblastes humains est définie à environ 1,5 kb durant la vie, représentant environ 30% de la longueur initiale à la naissance (Allsopp et coll. 1992). De façon générale, l'entrée en sénescence répllicative de la cellule est déterminée par le télomère le plus court de la cellule ayant atteint la longueur limite de stabilité cellulaire (der-Sarkissian et coll. 2004; Shay and Wright 2005). Au niveau de la longueur moyenne, cette limite a été établie à environ 6 kb (Baird et coll. 2003; Counter et coll. 1992).

Lorsqu'un télomère devient instable, les voies de signalisation reliées aux dommages à l'ADN (qui dépendent de TP53 et/ou RB1) contrôlent l'arrêt du cycle cellulaire. La cellule entre en sénescence répllicative et la prolifération est arrêtée. Si le cycle cellulaire n'est pas rétabli, la mort cellulaire sera enclenchée. Les télomères permettent de contrôler la réplication avant l'apparition de dommages à l'ADN causés par l'instabilité télomérique (section 1.3.4) (Gomez et coll. 2012; Londono-Vallejo 2009). Lorsque les télomères deviennent trop courts, la cellule entre en crise et peut survivre à cette crise en devenant immortelle grâce à l'implantation d'un mécanisme d'élongation des télomères (section 1.3.7) (Counter et coll. 1992).

La longueur des télomères varie d'un individu à l'autre, d'un chromosome à l'autre, d'un allèle à l'autre et aussi en fonction de l'âge (Graakjaer et coll. 2006; Samassekou et coll. 2010). En mesurant la longueur des télomères de spécimens d'âge néonatal à centenaire, il a été possible de montrer que cette longueur est caractéristique de chaque individu, que cette longueur raccourcit pendant la vie mais que la longueur initiale des télomères dépend de celle héritée des parents (Graakjaer et coll. 2004; Kappei and Londono-Vallejo 2008; Takubo et coll. 2002).

Des télomères courts ont été identifiés dans plusieurs syndromes de vieillissement prématuré et de prédisposition au cancer. On note, entre autres, 1) l'identification de l'importance de la télomérase sur la longueur initiale des télomères et dans le vieillissement prématuré des cellules à prolifération élevée par la mutation de TERC (*telomerase RNA component*) dans la dyskératose congénitale (Shay and Wright 2004), 2) l'haplo-insuffisance de TERT (*telomerase reverse transcriptase*) dans l'anémie aplasique (Chiang et coll. 2010; Du et coll. 2007; Yamaguchi et coll. 2005), 3) les problèmes de maintenance menant au raccourcissement et à la recombinaison des télomères dans l'anémie de Fanconi (Joksic et coll. 2012), 4) les cercles télomériques extrachromosomiques dans le syndrome de Werner (Joksic et coll. 2012; Reddy et coll. 2010) et 5) les problèmes de protection menant à l'instabilité dans l'ataxie télangiectasie (Gilson and Londono-Vallejo 2007; Sfeir and de Lange 2012; Shay and Wright 2004).

L'identification des causes de ces maladies a grandement contribué aux connaissances sur les télomères et ont montré l'importance de la longueur, de la stabilité et de la maintenance de ces structures.

1.3.2 Télomères dans les cellules du cerveau

Il est connu que la longueur des télomères varie selon le tissu étudié et le taux de prolifération des cellules. Pour ce qui est des télomères dans les cellules du cerveau, un groupe japonais a montré des longueurs moyennes dans la matière grise de $12,3 \pm 2,5$ kb et dans la matière blanche de $11,4 \pm 2,1$ kb en utilisant des échantillons du lobe occipital de patients autopsiés (Nakamura et coll. 2007). La comparaison entre les résultats de spécimens d'âges différents, de bébés et d'individus de plus de 60 ans, a montré une différence entre la matière blanche mais aucune différence avec la matière grise. Ces

résultats ont suggéré que les cellules gliales subissent une perte télomérique contrairement aux neurones qui, lorsque différenciées, ne se divisent plus (Ishii et coll. 2006; Nakamura et coll. 2007; Takubo et coll. 2002). Cette perte télomérique a été mesurée entre 0,05-0,88 kbp (Nakamura et coll. 2007).

1.3.3 Longueur individuelle des télomères

La longueur des télomères variant à chaque extrémité des chromosomes, il est possible de mesurer 92 longueurs différentes dans une cellule en métaphase normale. Cette différence dans la longueur individuelle dépend majoritairement des longueurs télomériques héritées des parents à la naissance (Graakjaer et coll. 2004). La longueur individuelle des télomères est un sujet peu étudié jusqu'à maintenant, vu la complexité des manipulations pour étudier les bras chromosomiques un par un. Les techniques de cytogénétique utilisées pour l'identification individuelle des chromosomes nécessitent des cellules en réplication pendant la phase mitotique et, préférentiellement, en prométaphase. Les chromosomes peuvent être visualisés et identifiés seulement au plus haut niveau de condensation de l'ADN, pendant la métaphase, la plus courte phase du cycle cellulaire (figure 5). Si les chromosomes ne peuvent être classés, il sera impossible d'identifier à quel bras chromosomique le télomère mesuré appartient.

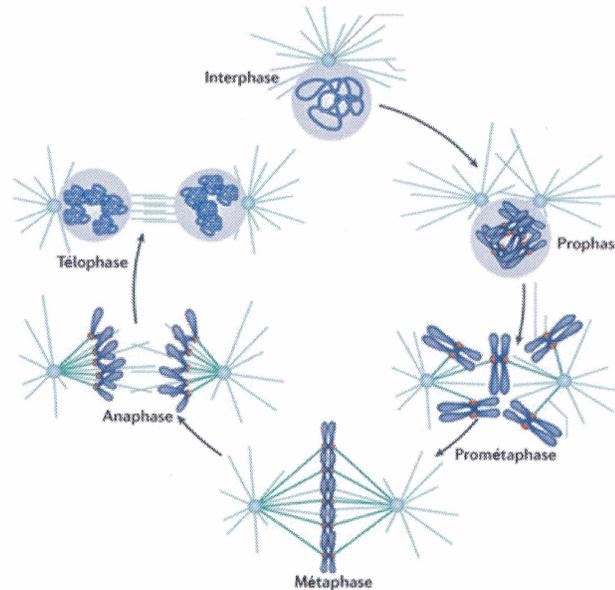


Figure 5. Ségrégation des chromosomes selon les phases du cycle cellulaire. La meilleure résolution des chromosomes est pendant la prométaphase (Verdaasdonk and Bloom 2011).

La longueur individuelle des télomères peut donc être plus facilement étudiée avec des cellules ayant un bon taux de division cellulaire lorsque mises en culture telles que les lymphocytes, les fibroblastes et les cellules immortalisées. L'étude dans des cellules non cancéreuses avec un faible taux de division cellulaire, telles que les cellules du cerveau, est jusqu'à présent impossible due à la difficulté d'obtenir des figures mitotiques par les techniques de cytogénétiques.

1.3.4 Méthode de mesure de la longueur des télomères

La longueur moyenne ainsi que la longueur individuelle des télomères peuvent être mesurées par différentes techniques ayant chacune ses avantages et désavantages (tableau 2). Dans le but d'obtenir la longueur moyenne et la longueur individuelle des télomères, les techniques d'analyse des fragments de restrictions terminaux (TRF) des télomères et de Q-FISH (*quantitative fluorescence in situ hybridization*) ont été utilisées dans le cadre du projet (section 2).

La technique d'analyse de base pour mesurer la longueur moyenne des télomères repose sur l'analyse de buvardage de type *Southern* pour les fragments de restrictions

terminaux (TRF) des télomères (tableau 2) (Slijepcevic 2001). Cette technique implique la digestion de l'ADN génomique par les enzymes *HinfI* et *RsaI* suivie d'une migration sur gel d'agarose. Une certaine partie des régions sous-télomériques est toutefois intégrée dans l'analyse de la longueur (Vera and Blasco 2012). Cette technique permet d'avoir une estimation de la moyenne de la longueur de tous les télomères des cellules présentes dans l'échantillon. L'analyse des bandes observées se fait par densitométrie.

La technique du Q-FISH permet d'estimer la longueur des télomères dans toutes les espèces contenant des sites télomériques dans leur génome (tableau 2) (Slijepcevic 2001). Les sondes PNA (*peptide nucleic acid*), des analogues aux acides nucléiques, sont utilisées dans la grande majorité des cas. Il s'agit de molécules chimériques qui sont très stables, en plus d'avoir une bonne résistance aux protéases et aux nucléases. Les PNA ne possèdent pas de charge et la stabilité de l'hybridation et la spécificité d'appariement est augmentée comparativement à des sondes à ADN ou ARN (Pellestor et coll. 2005). L'intensité des signaux correspond à la longueur relative des télomères étant donné que la quantité de sonde hybridée correspond au nombre de répétitions télomériques. La sensibilité analytique du FISH télomérique pour mesurer la longueur individuelle des télomères a été établie à 99% d'efficacité (Lansdorp et coll. 1996).

Tableau 2. Comparaison des techniques de mesure de la longueur des télomères. Tableau modifié de (Samassekou et coll. 2010).

	Techniques	Matériel	Avantages	Désavantages
Mesure de la longueur moyenne	TRF	ADN	-Comparaison facile entre les études	- Quantité d'ADN élevée - Technique longue
	Q-PCR	ADN	- Rapide - Faible quantité d'ADN	Ne peut pas être comparé à d'autres études
	Flow FISH	Cellules interphasiques	Peut mesurer différents types cellulaires	Préparation cytologique nécessaire
Mesure de la longueur individuelle	STELA	ADN	-Permet de mesurer des télomères très courts - Différenciation des allèles	Identification de quelques télomères seulement
	Q-FISH	Métaphases	Identification de la longueur individuelle de tous les télomères	Nécessite des cellules en mitose
	FISH télomères 3D	Cellules interphasiques	Identification du nombre, de l'intensité de la longueur individuelle des télomères et de la position des télomères	Identification des télomères impossible

D'autres techniques sont disponibles pour la mesure de la longueur moyenne des télomères (Q-PCR, Flow FISH) (tableau 2). Ces techniques n'ont pas été utilisées dans notre projet mais pourraient être utilisées comme perspective afin de confirmer les données obtenues par TRF. Pour ce qui est des autres techniques permettant d'étudier la longueur individuelle des télomères, elles ne permettent malheureusement pas d'identifier les bras chromosomiques.

1.3.5 Patrons de longueurs relatives individuelles

L'étude de la longueur individuelle relative des télomères a permis de montrer la présence d'un profil de longueurs retrouvé dans toutes les cellules d'un même individu ainsi que dans la population en général. Ce profil image la variation de longueur des télomères entre les différents bras chromosomiques, qui est conservée pendant la vie entière et transmis de génération en génération selon le mode mendélien (Graakjaer et coll. 2004; Graakjaer et coll. 2006). Jusqu'à maintenant, peu de laboratoires ont travaillé sur les longueurs individuelles.

L'équipe du Dr Yan s'est intéressée au patron de longueurs télomériques présent dans les cellules normales et leucémiques. Leur étude a permis d'identifier les télomères qui sont retrouvés parmi les plus longs et les plus courts dans les cellules de façon constitutive et dans le cancer (Samassekou et coll. 2011).

Les extrémités 17p, 22q, 19p, 17q, 16p et 12p ont été définis comme étant les télomères plus courts (en ordre croissant) et les extrémités 3p, Xp, 5p, 13q et 4q, les plus longs (ordre décroissant) dans les cellules normales (figure 6). Les télomères considérés plus long ou plus courts sont ceux ayant une différence non-significative avec le plus court ou le plus long télomère du profil ($p > 0,05$) (Samassekou et coll. 2011). En d'autres mots, les télomères les plus courts sont ceux qui ne sont pas statistiquement différents du plus court (i.e. 17p) et les plus longs, ceux qui ne sont pas différents du plus long (i.e. 3p). L'ensemble de nos données sur les télomères ont été récoltées à l'aide des mêmes méthodes et serviront d'éléments de comparaison. Les données sur les LMC sont présentées en 1.3.7.

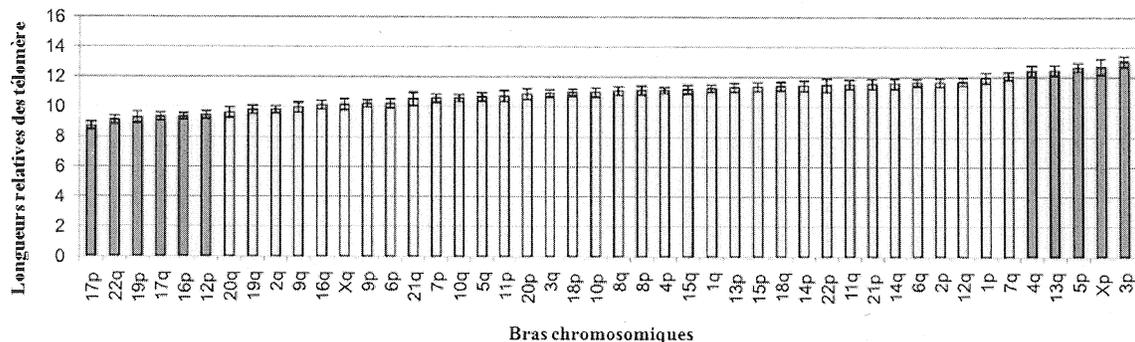


Figure 6. Longueurs relatives associées aux échantillons sanguins normaux. Les télomères en gris représentent les télomères considérés longs et courts de façon constitutive (Samassekou et coll. 2011).

1.3.6 Instabilité des télomères

Après chaque division cellulaire, entre 50 et 100 paires de bases sont perdues. Dans une cellule normale, les chromosomes sont arrangés en micro-territoires et la position des télomères dans la cellule est ainsi rigoureusement régulée (Cremer and Cremer 2010). Lorsqu'un des télomères devient trop court pour maintenir la stabilité du chromosome, il devient non fonctionnel. L'instabilité des télomères vient perturber l'architecture nucléaire des cellules et des micro-territoires. L'augmentation de l'instabilité et la proximité des télomères impliquent différents types de recombinaison par fusions des extrémités télomériques (*end-to-end fusion*) et par cycles de cassures et formation de ponts et de fusion (*breakage-bridge-fusion*, BBF) (figure 7) (Caporali et coll. 2007; der-Sarkissian et coll. 2004; Vermolen et coll. 2005). La fusion de chromosomes par leurs télomères fait partie de ces deux mécanismes. Le BBF implique des cycles de fusions, de cassures des chromosomes et d'autres fusions chromosomiques par les extrémités cassées non-protégées. Cette instabilité chromosomique causée par le raccourcissement des télomères ou, encore, par des mutations est souvent reliée au phénomène de carcinogenèse et aux nombreuses translocations retrouvées dans les tumeurs solides (Slijepcevic 2001).

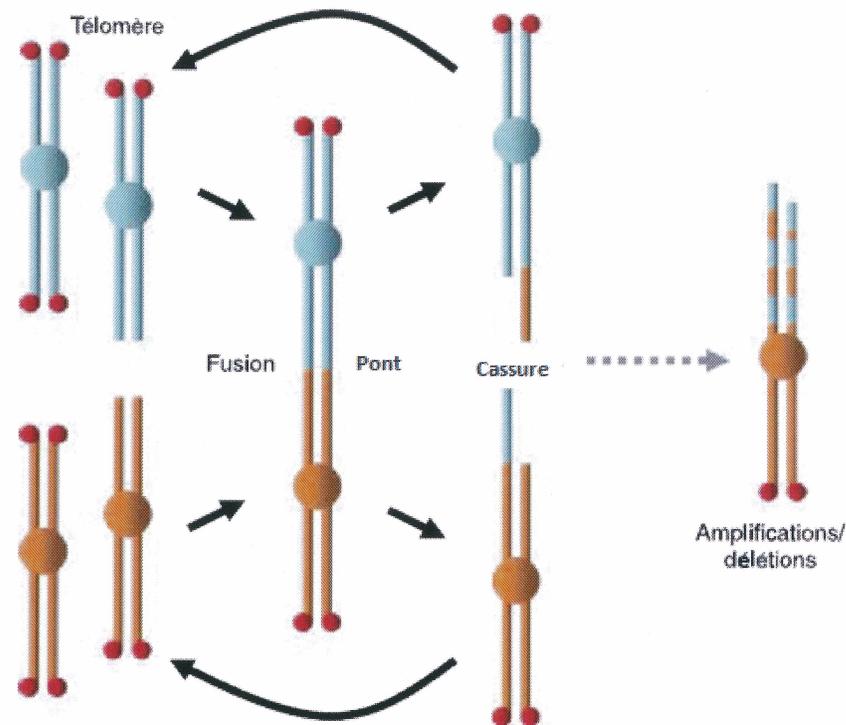


Figure 7. Formation de BBF suite à l'érosion des télomères. Figure modifiée de (Elsé 2009)).

1.3.7 Longueur des télomères dans le cancer

Il a déjà été établi que des télomères courts corrént avec l'instabilité génomique dans l'oncogenèse et peuvent être reliés à la sévérité de la maladie dans les leucémies et les lymphomes de haut grade (Ohyashiki et coll. 2002; Samassekou et coll. 2011).

L'équipe du Dr Yan a effectué les mêmes travaux sur des cellules de leucémies myéloïdes chroniques (LMC) que ceux sur les cellules normales (section 1.3.3.2) et a pu identifier différents changements dans ce profil de longueurs. Dans cette étude, il a été montré que la longueur de certains télomères est préférentiellement maintenue ou allongée dans les premiers stades de transformation de la LMC (Samassekou et coll. 2009; Samassekou et coll. 2011). En comparant la longueur individuelle des télomères en fonction de différents stades du cancer, ils ont observé que l'altération de la longueur des télomères se fait de façon spécifique au niveau de certains chromosomes. Le raccourcissement de ces chromosomes peut indiquer que la cellule est passée à un nouveau stade de malignité (Samassekou et coll. 2011). Dans les LMC, dix bras

chromosomiques ont été identifiés comme ayant une longueur de télomères particulièrement bien maintenue ou allongée: 4q, 5p, 7q, 11p, 13p, 13q, 14p, 15p, 18p et Xp et que six d'entre eux étaient aussi reconnus dans les échantillons normaux, mais de façon moins fréquente (4q, 5p, 13p, 13q, 14p et Xp) (Samassekou et coll. 2011). Ces télomères ont été définis comme longs lorsque leurs valeurs étaient supérieures à 2 écarts-types de la moyenne. De la même façon qu'avec les cellules normales, tel qu'expliquées précédemment, les télomères 21p, 22p, 20q, 2q et 21q ont été classés parmi les bras chromosomiques les plus courts dans les LMC seulement et les télomères 14p, 18p, 7q et 11p parmi les bras chromosomiques les plus longs (figure 8).

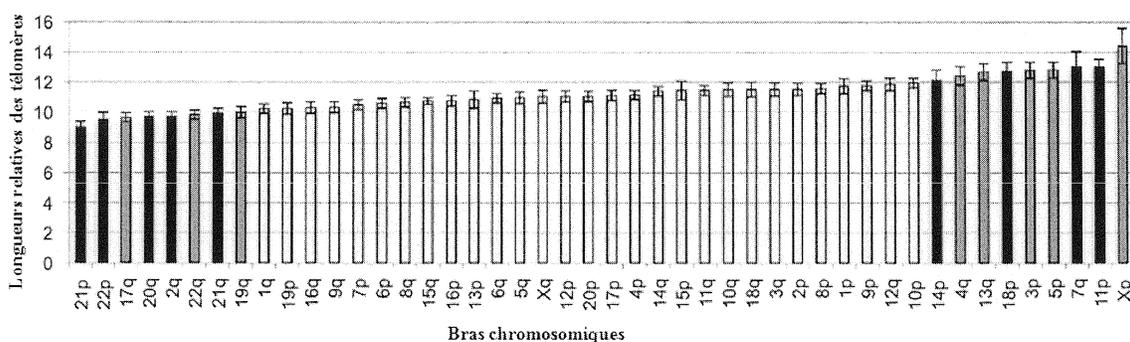


Figure 8. Longueurs relatives associées aux échantillons de LMC. En gris : les télomères les plus courts et les plus longs retrouvés dans les échantillons normaux et, en noir, les télomères supplémentaires correspondant à ceux identifiés dans les LMC. Les données du chromosome Y ne sont pas incluses. Figure modifiée de Samassekou et coll. (2011).

1.3.8 Mécanismes de maintien des télomères

Les mutations menant au cancer augmentent généralement la prolifération cellulaire, ainsi que la vitesse d'érosion télomérique. Afin de ne pas entrer en processus de sénescence et de mort cellulaire, la perte télomérique peut être compensée par l'activation de la télomérase ou par des mécanismes indépendants tels que l'allongement alternatif des télomères (ALT). Ces mécanismes de maintien des télomères sont nécessaires aux cellules cancéreuses pour leur permettre d'augmenter leur vie répliquative ou de conserver leur pouvoir de prolifération illimitée.

1.3.8.1 Réactivation de la télomérase

La télomérase est une enzyme qui possède une activité transcriptase inverse. Il s'agit d'une ribonucléoprotéine composée des sous-unités catalytiques *telomerase reverse transcriptase* (TERT) et d'une composante en ARN, la *telomerase RNA component* (TERC) agissant comme modèle pour l'addition de répétitions *de novo* de TTAGGG en 3' des télomères (Gomez et coll. 2012). Après l'hybridation des onze nucléotides du modèle d'ARN à l'extrémité complète en 3' du brin d'ADN, la synthèse se fait en complémentarité du brin d'ARN dans le site catalytique de l'enzyme. Une répétition hexanucléotidique est assemblée à chaque cycle (Gomez et coll. 2012; Mocellin et coll. 2013). La réactivation de la télomérase a pour cause principale la surexpression de la sous-unité TERT, le facteur limitant l'activité de l'enzyme (Du et coll. 2007; Mocellin et coll. 2013; Yamaguchi et coll. 2005).

La présence de l'activité de la télomérase à une quantité non-physiologique (c.-à-d., expression ectopique dans les cellules somatiques) contribue à effacer le profil de longueurs individuelles et tend à homogénéiser les longueurs (Gilson and Londono-Vallejo 2007; Gomez et coll. 2012; Londono-Vallejo et coll. 2001). Les cancers ayant une télomérase active semblent être reliés à une survie moins longue et à des tumeurs plus agressives comparativement aux cellules positives pour l'ALT (Hakin-Smith et coll. 2003; Kheirollahi et coll. 2011).

1.3.8.2 Allongement alternatif des télomères

Le mécanisme de l'ALT implique l'allongement des télomères par la recombinaison homologue des extrémités de façon indépendante de la télomérase. Le mécanisme exact est encore inconnu mais plusieurs mécanismes ont été proposés (Cesare and Reddel 2010). La caractéristique principale des cellules positives pour l'ALT est le recrutement et la présence de corps *promyelocitic leukaemia* (PML), une structure sub-nucléaire contenant de l'ADN, des protéines télomériques ainsi que des facteurs de recombinaison et de réparation de l'ADN (Verdun and Karlseder 2007). La technique de détection du mécanisme se fait par la détection des structures associées aux PML (corps leucémique promyélocytaire associé à l'allongement alternatif des télomères, APB) par

une combinaison d'immunofluorescence et de FISH télomérique (Henson et coll. 2005; McDonald et coll. 2010).

Des études sur l'ALT dans les GBM indiquent que la présence de ce mécanisme serait reliée à une survie plus longue et que ce mécanisme est souvent identifié chez des patients plus jeunes. Tel que mentionné précédemment, des mutations dans le gène IDH1 sont présentes dans les cellules positives pour l'ALT (McDonald et coll. 2010; Royds et coll. 2011). L'ALT serait aussi plus fréquemment retrouvé dans les astrocytomes de grade II et III et, par évolution, associé aux GBM secondaires (Henson et coll. 2005). Les mutations d'ATRX ont été associées à la présence du mécanisme alternatif d'élongation des télomères dans les astrocytomes secondaires (Jiao et coll. 2012). L'hétérogénéité des télomères est caractéristique de ce mécanisme d'élongation, principalement par la présence de télomères anormalement longs (Bryan et coll. 1995; Hakin-Smith et coll. 2003).

Tel que décrit précédemment, la co-présence de l'activité de la télomérase et de l'ALT a été documentée dans les GBM et est reliée à un pronostic positif pour les patients. Environ 40% des GBM n'ont pas de mécanisme clairement établi et ceux-ci sont reliés à une survie plus courte et à la présence d'un variant spécifique du gène CDKN2A (variant G500) (Royds et coll. 2011).

1.4 Caractéristiques moléculaires et chromosomiques des GBM

Malgré le fait que les GBM soient considérés comme un groupe très hétérogène de tumeurs, certaines caractéristiques ont été identifiées comme étant importantes dans l'évolution du cancer (Dahlback et coll. 2009). Au niveau moléculaire, certaines voies de signalisation ont été identifiées comme étant majoritairement impliquées dans les GBM (figure 9) (Bleeker et coll. 2012; Ohgaki and Kleihues 2007). Les voies EGFR/PI3K/Akt, Rb et p53 jouent un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération, la survie cellulaire, le contrôle du cycle cellulaire et dans l'apoptose (Bleeker et coll. 2012). Le déséquilibre dans ces voies de signalisation crée un nouvel état cellulaire propice à l'initiation du cancer. Les gènes faisant partie de ces voies sont pour la plupart déjà connus dans d'autres formes de cancer pour agir sur la prolifération illimitée, l'angiogenèse, l'inhibition de l'apoptose et la continuité du cycle cellulaire malgré la présence de

dommages à l'ADN (Bleeker et coll. 2012; Ohgaki and Kleihues 2007). Les gènes identifiés comme important dans les GBM primaires (PTEN, TP53, EGFR et secondaires (IDH1/2, CIC, ATRX, FUBP1) décrit précédemment ont aussi leur rôle à jouer dans l'évolution tumorale (Jiao et coll. 2012; Ohgaki and Kleihues 2013). Les altérations génétiques dans le gène ATRX a été récemment étudié en association avec les mutations de *TP53*, *IDH1* et *IDH2*. Les modifications d'ATRX ont été identifiées dans 80% des GBM secondaires et chevauchent la présence des mutations dans les gènes *IDH1/2* et *TP53*(Figure 3)(Liu et coll. 2012; Ohgaki and Kleihues 2013).

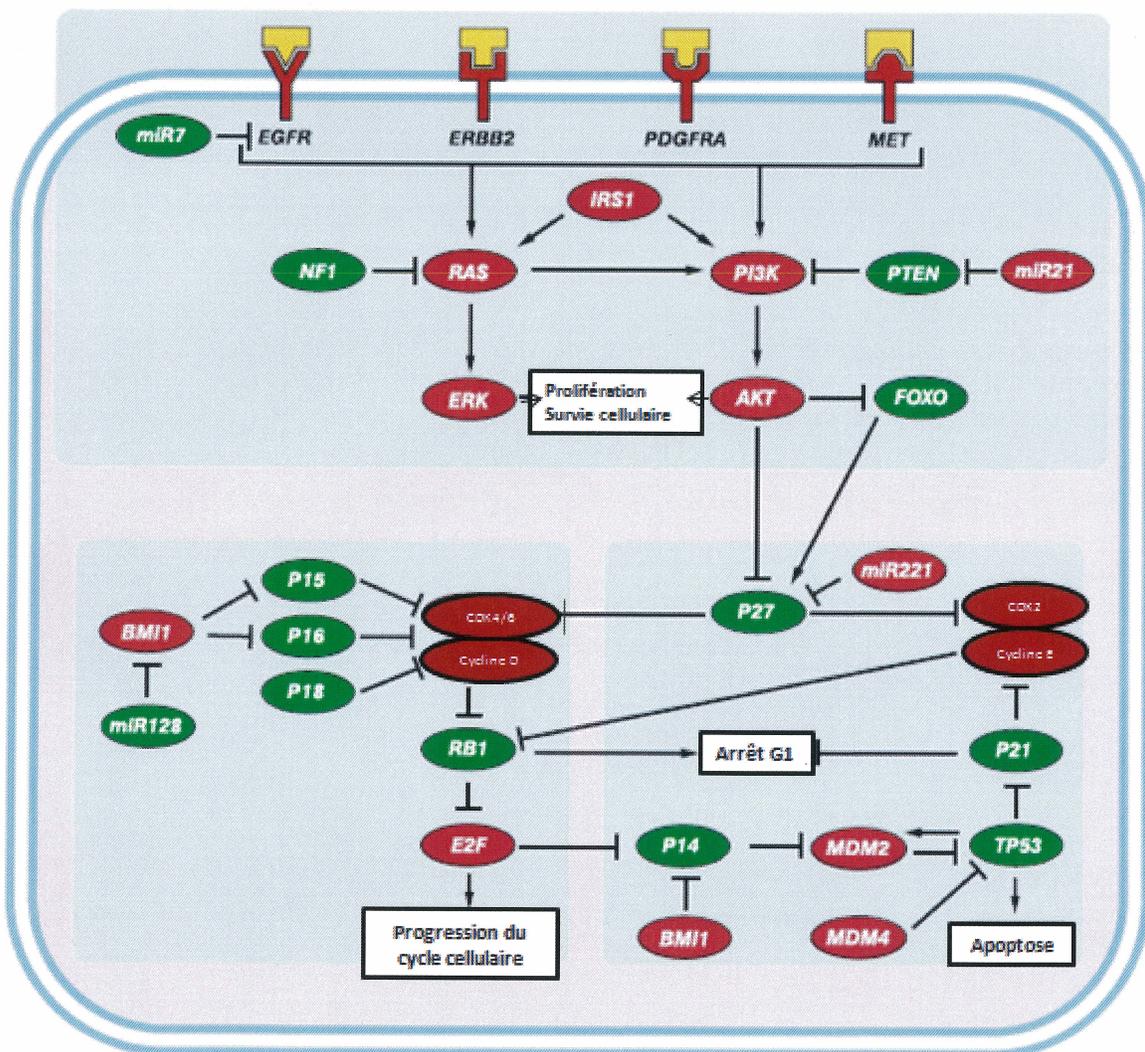


Figure 9. Voies de signalisations majoritairement impliquées dans les GBM. On retrouve la voie EGFR/PI3K/AKT, la voie RB et P53. Les suppresseurs de tumeurs sont identifiés en vert et les oncogènes en rouge. (Bleeker et coll. 2012)

On connaît déjà l'activation des oncogènes et la désactivation des gènes suppresseurs de tumeur comme des événements nécessaires au processus de cancérogenèse. L'initiation et la progression du cancer peuvent être causées par plusieurs altérations génétiques. On parle alors de mutations ou encore d'anomalies de structure (figure 10) ou d'anomalies de nombre (aneuploïdie, polyploïdie).

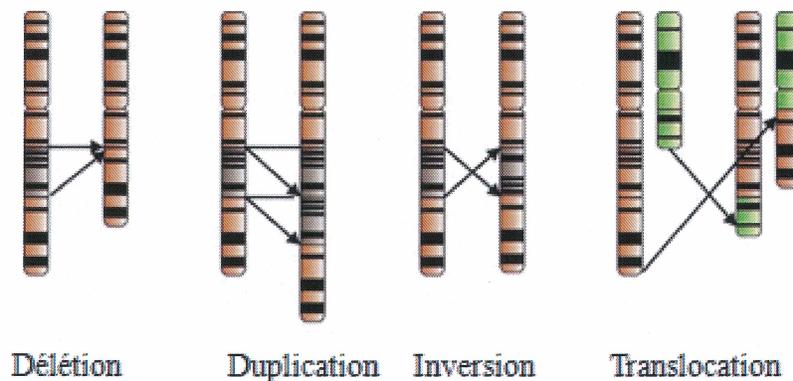


Figure 10. Anomalies de structure dans l'initiation ou la progression du cancer (Bu and Cao 2012).

1.4.1 Anomalies de nombre et de structure

Les anomalies de structure chromosomique ne sont pas toutes visibles au caryotype. La résolution de ce dernier dépend de la préparation de cellule et de la condensation des chromosomes. Avec les GBM, la résolution des caryotypes est souvent faible et il y a souvent présence d'aneuploïdies. L'identification de certains chromosomes peut être très difficile en présence de plusieurs chromosomes surnuméraires. De plus, lorsqu'un trop grand nombre de réarrangements sont présents dans une cellule et que la résolution est faible, il est nécessaire d'effectuer une hybridation *in situ* multicolore observée en fluorescence (M-FISH). Cette technique permet d'identifier les différents chromosomes présents dans la cellule dans les cas de translocations et d'aneuploïdies mais ne permet pas de voir les petites délétions, duplications et inversions.

Les techniques d'hybridation génomique comparative (CGH) sur chromosomes permettent d'identifier les amplifications et délétions de gènes (~10-20 Mb) (Kowalska et coll. 2010). Le dosage des gènes d'un échantillon peut aussi être fait avec CGH sur micropuces et les petites délétions intragéniques peuvent être reconnues par micropuces de séquençage de polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) (Coe et coll. 2007). Cette

dernière technique permet aussi de discerner les allèles, permettant d'identifier les pertes d'hétérozygotie (LOH) (Bleeker et coll. 2012). La LOH représente la présence de 2 allèles identiques (c.-à-d., pouvant être mutés tous les deux et augmentant la vulnérabilité au cancer) (Fujisawa et coll. 2000) ou la perte d'un allèle par délétion.

Plusieurs études ont déjà été faites sur les anomalies dans les GBM et on associe des pertes et des gains de matériel génétique à des gènes impliqués dans la cancérogenèse. Les monosomies des chromosomes 10, 13, 15, 22, 14 et 16 et la perte du chromosome Y ont été décrites (Dahlback et coll. 2009). Parmi les délétions identifiées en CGH, on note les pertes de copies de gènes sur les bras 1p, 3p, 5p, 9p, 13q (CDKN2A, CDKN2B, PTPRD) 19q et 22q (Bleeker et coll. 2012; Dahlback et coll. 2009; Zuber et coll. 2002a; Zuber et coll. 2002b). La délétion ou la LOH du bras long du chromosome 10 (PTEN, MGMT, ANXA7, inhibiteur d'EGFR) reste la plus connue au niveau des GBM primaires et secondaires et est associée à un mauvais pronostic (Dahlback et coll. 2009; Ohgaki and Kleihues 2013). Les pertes peuvent être de longueurs variables et seules les grandes délétions peuvent être identifiées par caryotype, sans nécessairement identifier le point de cassure.

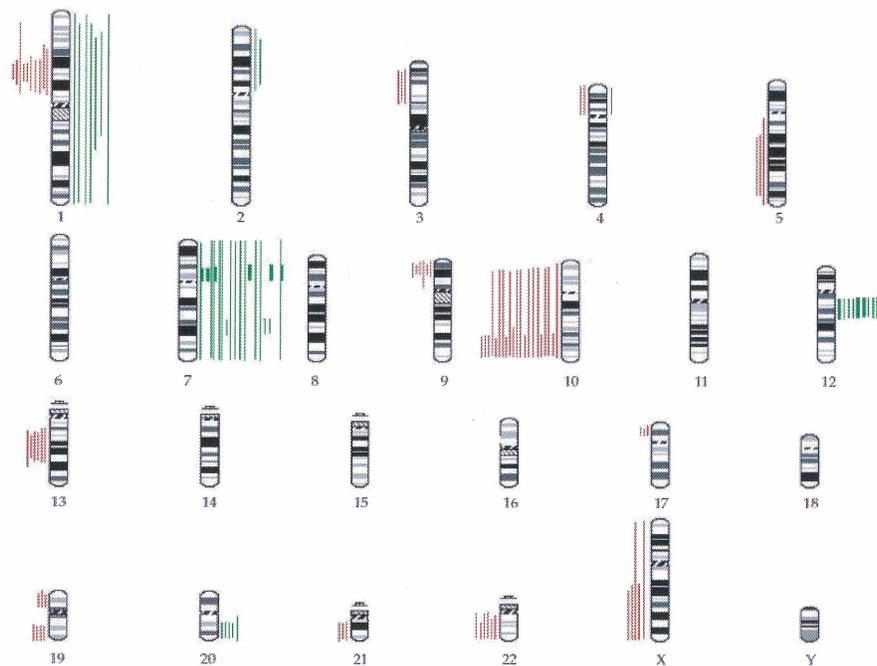


Figure 11. Sommaire des variations du nombre de copies de spécimens de GBM. Les délétions sont identifiées en rouge et les amplifications en vert. Figure d'Arslantas et coll. (2007).

En ce qui concerne les amplifications fréquentes, nous pouvons mentionner certains segments des chromosomes 1, 7 (EGFR, MET) 2, 4q (KIT, KDR, PDGFRA), 12q (CDK4, MDM2), 19 et 20 (figure 11; tableau 3) en plus des trisomies 1 et 7 (Bleeker et coll. 2012; Dahlback et coll. 2009). Des variations dans le nombre de copies de plusieurs gènes sont rapportées à plusieurs reprises dans les études sur le GBM. La proportion de tumeurs dans lesquels ces gènes sont modifiés est très variable (Tableau 3). Le dosage de ces gènes peut être modifié par une anomalie de structure mais aussi par des mutations (section 1.4.2).

1.4.2 Modification de l'information génétique : mutations

Plusieurs gènes ont déjà été identifiés comme étant mutés dans les GBM (tableau 4). Le pourcentage des cancers dans lesquels ces mutations ont été repérées reste tout de même en deçà de 40%, probablement dû à la grande hétérogénéité des GBM. Ces changements fonctionnels dans les tumeurs peuvent tout de même aider à mieux décrire l'évolution des tumeurs et le pronostic des patients.

Ces gènes sont pour la plupart déjà identifiés dans d'autres types de cancer et, encore, le pourcentage de tumeurs caractérisées par ces mutations est inférieur à 40%. Plusieurs gènes ont aussi été identifiés comme étant fréquemment surexprimés ou bloqués par des miRNA mais ne seront pas discutés (Bleeker et coll. 2012). Les changements dans les gènes identifiés comme des événements importants dans les GBM peuvent être causés par des anomalies de structure ou des mutations. L'identification de ces acteurs peut mener au développement de nouvelles thérapies comme, par exemple, les inhibiteurs d'EGFR étudiés comme traitement du GBM (Fenton et coll. 2012; Gadji et coll. 2009b; Jackson et coll. 2013). De façon générale, plusieurs gènes ont été reconnus comme ayant un rôle dans les GBM mais, dû à l'hétérogénéité de ce type de cancer, le pourcentage de tumeurs dans lesquels ces caractéristiques sont retrouvées est limité. En d'autres mots, aucune caractéristique commune à tous les GBM n'a encore été identifiée.

Tableau 3. Gènes identifiés dans les altérations du nombre de copies fréquentes dans les GBM par Bleeker et coll. (2012). La fréquence (%) correspond au pourcentage de cas étudiés ayant l'altération.

Chromo-some	Bande	Altération	Fréquence (%)	Gène	Nom du gène	Fonction de la protéine
1	1p32	Délétion	3-16	<i>CDKN2C</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C</i>	Régulateur du cycle cellulaire
1	1p36	Délétion	14-40	?		
1	1q32	Amplification	4-15	<i>MDM4</i>	<i>Mdm4 p53 binding protein homolog</i>	Apoptose
1	1q44	Amplification	2-11	<i>AKT3</i>	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3</i>	Signalisation, prolifération et survie
2	2q22	Délétion	7	<i>LRP1B</i>	<i>LRP1B low density lipoprotein receptor related protein 1B</i>	Signalisation, prolifération et survie
3	3q26	Amplification	0-16	<i>PIK3CA</i>	<i>Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>	Signalisation, prolifération et survie
4	4q12	Amplification	15	<i>KIT</i>	<i>V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>	Signalisation, prolifération et survie
4	4q12	Amplification	15	<i>KDR</i>	<i>Kinase insert domain receptor</i>	Angiogenèse, vasculogenèse croissance des cellules endothéliales
4	4q12	Amplification	2-18	<i>PDGFRA</i>	<i>Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide</i>	Signalisation, prolifération et survie
6	6q26-27	Délétion	25	<i>PARK2</i>	<i>Parkinson protein 2</i>	Dégradation par le protéasome
7	7q11	Amplification	23-66	<i>EGFR</i>	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	Signalisation, prolifération et survie
7	7q21	Amplification	1	<i>CDK6</i>	<i>Cyclin-dependent kinase 6</i>	Régulateur du cycle cellulaire
7	7q31	Amplification	3-19	<i>MET</i>	<i>Met proto-oncogene</i>	Signalisation, prolifération et survie
9	9p21	Délétion	26-66	<i>CDKN2A</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>	Régulateur du cycle cellulaire
9	9p21	Délétion	31-66	<i>CDKN2B</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B</i>	Régulateur du cycle cellulaire
9	9p23	Délétion	14-46	<i>PTPRD</i>	<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type D</i>	Signalisation, prolifération et survie
10	10q23-24	Délétion	5-70	<i>PTEN</i>	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>	Signalisation, prolifération et survie
12	12p13	Amplification	2-14	<i>CCND2</i>	<i>Cyclin D2</i>	Régulateur du cycle cellulaire

12	12q14	Amplification	7-24	<i>CDK4</i>	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>	Régulateur du cycle cellulaire
12	12q14-15	Amplification	7-22	<i>MDM2</i>	<i>Mdm2 p53 binding protein homolog</i>	Apoptose
13	13q14	Délétion	3-47	<i>RB1</i>	<i>Retinoblastoma 1</i>	Régulateur du cycle cellulaire
17	17p13	Délétion	1-22	<i>TP53</i>	<i>Tumor protein p53</i>	Apoptose
17	17q11	Délétion	0-11	<i>NF1</i>	<i>Neurofibromin 1</i>	Signalisation, prolifération et survie
19	19q	Délétion	11-35	?		
22	22q12.3	Délétion	11-53	<i>TIMP3</i>	<i>TIMP metallopeptidase inhibitor 3</i>	Matrice extracellulaire

? = non identifié

Tableau 4. Gènes fréquemment mutés dans les GBM. Tableau modifié de Bleeker et coll. (2012).

Gène	Chromosome	Nom du gène	% mutations ponctuelles
<i>EGFR</i>	7	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	14-15
<i>ERBB2</i>	17	<i>V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>	0-7
<i>IDH1</i>	2	<i>Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP?)</i>	12-20
<i>NF1</i>	17	<i>Neurofibromin 1</i>	15-17
<i>PIK3CA</i>	3	<i>Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>	7-10
<i>PIK3R1</i>	5	<i>Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>	7-8
<i>PTEN</i>	10	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>	24-37
<i>PTPRD</i>	9	<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type, D</i>	0-6
<i>RB1</i>	13	<i>Retinoblastoma 1</i>	8-13
<i>TP53</i>	17	<i>Tumor protein p53</i>	31-38

1.4.3 Les glioblastomes pédiatriques

Bien que cette étude ne porte qu'exclusivement sur le glioblastome adulte, il est important de préciser les modifications ayant été identifiées dans les GBM pédiatriques. On note particulièrement chez l'enfant des mutations somatiques dans la cascade de signalisation de remodelage de la chromatine H3.3-ATR-X-DAXX (44% des tumeurs pédiatriques), principalement des mutations dans les gènes régulant les modifications post-traductionnelles des histones H3.3 et H3.1 (SETD2) (Fontebasso et coll. 2013; Khuong-Quang et coll. 2012; Schwartzentruber et coll. 2012). Les mutations d'H3F3A ont été retrouvées dans seulement 3,4% des GBM adultes (Liu et coll. 2012).

Les mutations d'ATRX et DAXX affectent l'incorporation de l'histone H3.3 dans l'hétérochromatine péricentrique et dans les télomères (Liu et coll. 2012; Schwartzenruber et coll. 2012). La présence de mutations dans la voie de signalisation H3F3A/ATRX-DAXX/TP53 est fortement corrélée avec le mécanisme alternatif d'élongation alternative des télomères et indique l'importance de la régulation de l'architecture de la chromatine dans la pathogenèse du GBM (Jiao et coll. 2012; Schwartzenruber et coll. 2012).

1.5 Objectifs et questions de travail

L'augmentation des connaissances des mécanismes d'oncogenèse et d'évolution du cancer a un poids considérable dans la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques ou de marqueurs moléculaires. Le pronostic des patients atteints de GBM peut être très variable et l'identification de nouveaux marqueurs caractéristiques de l'évolution du cancer permettrait une meilleure estimation de l'évolution de la maladie ou de la réponse au traitement des patients. L'absence de données sur les profils individuels des télomères sur les GBM nous amène à continuer la caractérisation et la recherche sur l'implication de la longueur des télomères dans l'évolution des GBM.

L'objectif principal de ce projet est de caractériser pour la première fois la longueur individuelle des télomères dans les GBM en corrélation avec le pronostic et les anomalies chromosomiques. Pour ce faire nous avons analysés 12 spécimens de GBM pour lesquels nous avons établis les objectifs suivants :

- Identifier la longueur moyenne des télomères par la technique de TRF;
- Déterminer le patron des longueurs individuelles relatives pour chaque spécimen en utilisant les techniques de Q-FISH et de M-FISH;
- Identifier les différentes anomalies chromosomiques présentes, le nombre et la variabilité de ces anomalies ainsi que les chromosomes impliqués de façon récurrente dans les anomalies de nombre et de structure;
- Identifier les bras chromosomiques les plus longs et les plus courts dans chacun des spécimens;
- Comparer les observations de la longueur des télomères et des anomalies chromosomiques avec les données cliniques des patients ainsi que les données recensées dans la littérature scientifique;

Nous pourrions déterminer si le profil retrouvé dans les GBM les moins agressifs ressemble davantage au profil identifié dans les lymphocytes normaux et s'il y a présence de similarités avec les LMC. Nous croyons aussi qu'il est possible d'identifier certains bras chromosomiques dont la régulation de la longueur des télomères est exclusive à l'évolution des GBM. Les anomalies chromosomiques identifiées nous permettent de vérifier quels chromosomes sont perdus ou dupliqués de façon récurrente et s'il existe un lien avec le profil de longueurs individuelles des télomères. Nous voulons aussi vérifier si les chromosomes ayant des télomères courts sont observés davantage dans les réarrangements chromosomiques et si les cas ayant un grand nombre d'anomalies présentent des télomères plus courts accompagnés d'une survie plus courte. L'identification de nouvelles caractéristiques du GBM pourrait nous lancer sur de nouvelles pistes concernant l'agressivité du cancer, l'évolution et la survie du patient.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Sélection des tumeurs

Toutes les tumeurs gliales proviennent de patients opérés par les neurochirurgiens Dr David Fortin et Dr David Mathieu du Service de neurochirurgie dans le Département de chirurgie du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS). Les patients ont consenti à la mise en banque des biopsies tumorales et le projet de recherche a été approuvé par le comité d'éthique à la recherche en santé chez l'humain du CHUS et de l'Université de Sherbrooke (certificat #11-088). Les tumeurs avec un diagnostic neuropathologique de GBM ont été sélectionnées pour l'étude.

2.2 Culture primaire de cellules gliales

Les spécimens de tumeurs ont été récupérés dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Wisent Bioproducts, St-Bruno, Québec, Canada) non supplémenté directement au bloc opératoire lors des chirurgies de résection ou de biopsie. La mise en culture du spécimen a été effectuée par fragmentation à l'aide d'un scalpel et avec ajout de 1 mL de sérum de bovin fœtal (FBS) (Wisent Bioproducts) et 1 mL de milieu de culture complété (DMEM, 10% FBS, 2% pénicilline-streptomycine). La même quantité de FBS et de milieu a été ajoutée à des intervalles de 3 jours jusqu'à un total de 6 mL dans un pétri de 10 mm de diamètre. Par la suite, les changements de milieux ont été faits jusqu'à une confluence de 70 à 80%. Les cellules ont été conservées en tout temps dans un incubateur à 37°C avec 5% CO₂.

Lorsque la confluence des cellules était atteinte, le milieu a été retiré et les cellules ont été lavées avec du Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) préchauffé à 37°C. Les cellules ont été décollées de la paroi du contenant en présence de trypsine 0,25%/EDTA 0,53 mM pendant 2 à 5 minutes à 37°C. Les cellules étaient ensuite suspendues dans du milieu et diluées pour être remises en culture à une confluence de 15 à 20%.

2.3 Congélation des cellules

Lorsque décollées par la trypsine et suspendues dans le milieu, les cellules ont été centrifugées à 1 700 x g pendant 5 minutes. Le surnageant était alors retiré et le culot de cellules dilué dans un milieu de congélation [50% DMEM, 40% FBS, 10% diméthylsulfoxyde (DMSO)]. Les tubes de congélation ont été mis à -80°C et ont été transférés dans l'azote liquide après 24 heures.

2.4 Préparation de culot de cellules

Les mêmes manipulations que l'étape de congélation des cellules ont été effectuées jusqu'au retrait du surnageant. Le culot de cellules a alors été lavé avec du HBSS et transféré dans des microtubes de 1,5 mL. Une centrifugation de 2 minutes à 12 000 x g a permis de précipiter les cellules. Le surnageant a été retiré et le culot a été congelé et conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

2.5 Récolte de cellules adhérentes

Les cellules en culture ont été décollées tel que décrit en section 2.2 et le milieu de culture a été changé (DMEM complété). La colchicine – Colcémide (KaryoMAX colcemid solution 10 µg/mL, Gibco, Life Technologies Inc., Burlington, Ontario, Canada) a été ajoutée au milieu à une concentration finale de 50 pg/mL. La récolte débutait entre 2 et 18 heures après l'ajout de Colcémide. Le temps d'action de cette dernière a été déterminé en fonction du temps de réplication du spécimen, qui était, en moyenne, de 18 heures pour les gliomes.

Après l'incubation avec Colcémide, le milieu de culture était retiré et conservé. Les cellules étaient rincées au HBSS et elles étaient décollées. Le milieu de culture était rajouté dans la boîte de Pétri pour recueillir les cellules et celles-ci ont été centrifugées à 1 350 x g pendant 5 minutes. Une fois le surnageant enlevé, les cellules étaient prêtes pour le choc hypotonique : goutte à goutte, environ 4 mL de citrate de sodium 0,8% ont été ajoutées avec agitation des cellules à l'aide d'un vortex. Le volume était complété à 12 mL et les cellules ont été incubées à 37°C pour 30 minutes. Pour chaque tube, 1 mL d'acide acétique 5% a été ajouté pour la pré-fixation. Les cellules ont été centrifugées. La fixation des cellules s'est fait en ajoutant environ 4 mL de Carnoy (méthanol : acide acétique 3:1)

goutte à goutte, au vortex. Le volume a été complété à 12 mL et les tubes ont été laissés au repos pour 10 minutes à la température de la pièce. Les étapes de centrifugation et d'ajout de Carnoy ont été répétées 3 fois avant de suspendre les cellules dans 1 à 2 mL de Carnoy 1:1. Les lames ont ensuite été étalées en laissant tomber une goutte par lame dans une chambre à température et à humidité contrôlées (Thermotron, Holland, MI). Les lames ont été étalées à 55% d'humidité et 22°C. La solution de cellules métaphasiques ainsi que les lames étalées ont été conservées à -20°C.

2.6 Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été effectuée avec le kit Gentra Puregene (Qiagen, Toronto, Ontario, Canada) en utilisant le protocole de la compagnie pour l'extraction d'ADN de cellules en culture. Les culots de cellules ont été décongelés le plus rapidement possible à 37°C avec agitation et la solution de lyse cellulaire a été ajoutée. Les tubes étaient agités sur le vortex à haute vitesse pour 10 secondes. Un traitement à la ribonucléase a ensuite été fait avec agitation par inversement et une incubation de 5 minutes à 37°C. Les tubes ont été incubés une minute sur glace avant d'être centrifugés à 13 000 x g. Les protéines ont précipité avec la solution de précipitation et les tubes ont été agités et centrifugés à nouveau. Le surnageant a été ajouté à l'isopropanol pour la précipitation de l'ADN et le tout a été centrifugé à nouveau. Le culot d'ADN a ensuite été lavé avec de l'éthanol 70% froid. L'ADN a été suspendu dans la solution commerciale de réhydratation de l'ADN. La concentration d'ADN a été définie par l'absorbance à 260 nm et sa pureté par le ratio de l'absorbance à 260 nm sur l'absorbance à 280 nm. Le ratio doit être entre 1,7 et 1,9 pour que l'échantillon soit jugé de bonne qualité pour la poursuite des expériences. Les tubes d'ADN ont été conservés à -20°C.

2.7 Analyse de la longueur moyenne des télomères

La technique des fragments de restriction des télomères (TRF) a permis d'obtenir la longueur moyenne des télomères. Les réactifs du kit DIG High Prime DNA Labeling Detection Starter Kit II (Roche, Laval, Québec, Canada) ont été utilisés pour cette technique. Entre 2 et 5 µg d'ADN étaient digérés pendant 18 heures à 37°C avec les enzymes de restriction HinfI et RsaI (New England Biolabs, Pickering, Ontario, Canada).

Les échantillons ainsi que des marqueurs de poids moléculaires couplés à la digoxygénine (DNA Molecular Weight Marker II DIG labeled 0,12-23,1 kbp, Roche) étaient déposés sur gel d'agarose 0,8% dans du tampon Tris-acétate-EDTA et migrés à 50 V pendant 4 à 5 heures. Le gel était coloré au bromure d'éthidium et photographié. L'ADN dans le gel a été dépuriné avec du HCl 0,25 N, dénaturé dans du NaOH 0,5 M-NaCl 1,5 M et neutralisé avec une solution de Tris-HCl 0,5 M-NaCl 3 M pH 7,5. Le gel a ensuite été monté pour être transféré sur une membrane de nylon chargée positivement (Roche). Le montage de transfert de type *Southern* a été fait selon par capillarité (Figure 12).

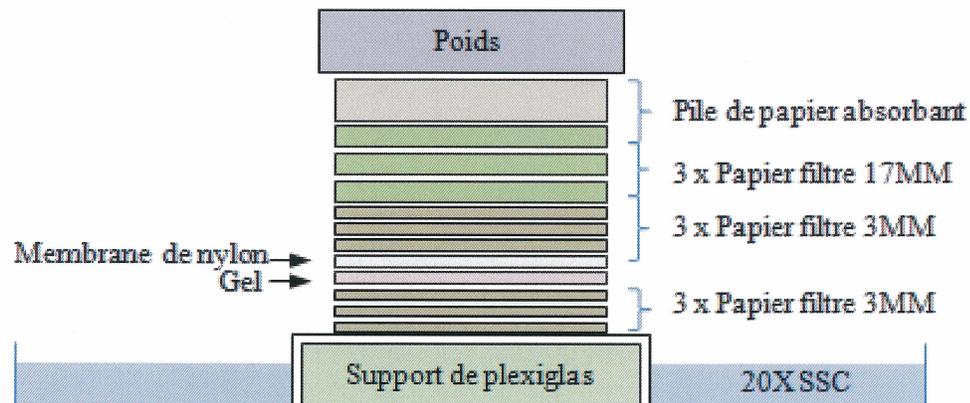


Figure 12. Montage de type *Southern* utilisé pour la technique TRF.

Après transfert d'une nuit dans du SSC 20X, l'ADN a été fixé sur la membrane par rayons ultraviolets (UVC; 120 mJ/m²). La membrane a été pré-hybridée pendant 60 minutes à 37°C avec une solution d'hybridation (DIG Easy Hyb, Roche) et hybridée toute la nuit à 37°C avec cette même solution contenant la sonde (CCCTAA)₃ couplée à la DIG (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). Après une série de lavages stringents avec des solutions de SSC 2X-SDS 0,1%, SSC 0,2X-SDS 0,1% (37°C) et d'acide maléique 0,1 M-NaCl 0,15 M-Tween 20 0,3%, la membrane a été bloquée avec une solution de blocage (Blocking Solution, Roche) et incubée avec une solution d'anti-DIG couplée à la phosphatase alcaline (Anti-DIG AP-conjugate, Roche) à une concentration de 75 mU/mL pendant 30 minutes à température ambiante. Le substrat de chimioluminescence CSPD (Roche) a été utilisé pour la révélation de l'ADN hybridé. La détection des télomères a été faite par exposition sur film photographique. Le film a ensuite été numérisé et analysé avec

le logiciel Image J (Version 1.45, NIH, USA). L'équation logarithmique du poids moléculaire a été établie avec les marqueurs en fonction de la migration du gel. La longueur moyenne des télomères est définie par l'équation : $TRF = \frac{\sum(pixel)}{\sum(\frac{pixel}{PM})}$.

2.8 PNA FISH (Q-FISH)

La technique Q-FISH a été effectuée sur les lames étalées selon les méthodes conventionnelles de cytogénétique (section 2.5). Le vieillissement des lames a été réalisé à 37°C pendant 24 heures. Celles-ci ont ensuite été trempées dans différents bains : TBS pour 2 minutes, formaldéhyde 3,7% pour 2 minutes, TBS pour 2 fois 5 minutes, solution de prétraitement (pepsine 0,01%, HCl 0,01 N) pour 3 minutes, TBS pour 2 fois 5 minutes et éthanol 70%, 80% et 100% pour 2 minutes chacun. Après séchage, 10 µL de sonde d'acide nucléique peptidique (PNA) couplée à la fluorescéine isothiocyanate-(CCCTAA)₃ ou au Cy3 (PNA Bio Inc, Thousand Oaks, CA) diluée à 50 µM dans une solution d'hybridation (Na₂HPO₄ 20 mM pH 7,4, Tris 20 mM pH 7,4, formamide 60% dans SSC 2X, 0,1 µg/mL sperme de saumon) a été déposés sur chaque lame.

Les lames ont été dénaturées pendant 3 min à 80°C sur la plaque PCR et incubées pendant 60 minutes à la température de la pièce, à l'obscurité. Les lavages de la sonde ont été faits dans du SSC 0,4X-NP 40 0,3% pour 1 minute, suivi de la même solution à 65°C pendant 2 minutes et de SSC 2X-NP-40 0,1% pendant 1 minute. Les lames ont ensuite été montées avec la solution de p-phenylenediamine (PPD, Sigma Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) et de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (50 ng/mL) pH 9,0. Les lames étaient conservées pendant 2 jours à température pièce pour le marquage en bande DAPI avant la prise de photo.

2.9 Hybridation in situ multicolore observée en fluorescence (M-FISH)

Afin d'identifier de façon spécifique les chromosomes pour l'identification individuelle de chacun des télomères dans ce projet, la technique de M-FISH a été effectuée. Cette technique utilise une combinaison de 5 fluorochromes permettant l'identification des 22 autosomes et des 2 chromosomes sexuels humains en les marquant chacun d'une couleur distincte. Cette technique est utilisée dans les cas de cellules aneuploïdes, de préparations

de métaphases de faible résolution et/ou de mauvaise qualité et lors de la présence de nombreuses translocations.

Le M-FISH a été fait sur les mêmes lames que celles du Q-FISH. Le protocole de la compagnie pour les sondes 24XCyte (MetaSystem Group Inc, Whaltham, MA) a été réalisé. Les lamelles et le milieu de montage étaient retirés par 3 bains de TBS de 5 minutes. Les lames étaient ensuite incubées pendant 30 minutes dans le SSC 2X à 70°C et refroidies à la température de la pièce pendant 20 minutes. Elles ont été transférées dans plusieurs bains d'une minute chacun avant d'être séchées à l'air: SSC 0,1X, NaOH 0,07N (4°C), SSC 0,1X (4°C), SSC 2X, éthanol 70%,80% et 100%.

Environ 10 µL de sonde 24XCyte par lame a été dénaturé à 75°C pour 5 minutes puis mis sur la glace avant d'être incubé pendant 30 min à 37°C. La sonde a pu être ensuite appliquée sur les lames. Celles-ci ont été scellées et mises en chambre humide à 37°C pendant 48 heures.

Les lamelles ont ensuite été décollées et les lames ont été déposées dans du SSC 0,4X à 72°C pour 2 minutes, suivi de SSC 2X pour 30 secondes. Les lames ont été rincées à l'eau distillée et montée avec du PPD/DAPI (50 ng/mL) pH 7,5.

2.10 Prise de photo, caryotypage et mesures des longueurs des télomères

Les photos de Q-FISH et M-FISH ont été prises avec le microscope à épifluorescence semi-automatisé (Olympus BX61; Olympus America Inc, Center Valley, PA) et une caméra Compulog IMAC-CCD S30 (Metasystem Group Inc). Le logiciel Metafer v3.3.6 (Metasystem Group Inc) a été utilisé pour le balayage automatique des lames. Les images ciblées ont été analysées à l'aide du logiciel ISIS v5.2 (Metasystem Group Inc). Le caryotype a été fait en fonction du marquage multicolore du M-FISH et appliqué aux mêmes lames et aux mêmes métaphases en Q-FISH.

Les télomères sont été mesurés sur les métaphases caryotypées avec la fonction *Telomere Measurement* du logiciel ISIS, permettant de mesurer l'intensité individuelle de chacune des extrémités télomériques sur le caryotype. Le bruit de fond des images a été automatiquement corrigé par le système d'analyse d'images.

2.11 Analyses statistiques des mesures individuelles des télomères

Les données inférieures à une intensité de signal de 10 unités ont été retirées de l'analyse puisqu'elles ont été jugées comme étant inférieures ou équivalentes au bruit de fond. Les valeurs d'intensité de signal de chaque cellule ont été transformées en longueur télomérique (kb) à l'aide de la longueur relative moyenne obtenue par TRF. Les valeurs de chaque cellule ont été ensuite transformées individuellement selon la moyenne d'intensité de signal dans chaque cas. Les chromosomes significativement plus longs et plus courts ont été déterminés avec les valeurs inférieures au rang percentile 2,5% et supérieures au percentile 97,5% pour chacun des spécimens. Ceux-ci ont été considérés comme significativement différents de la moyenne. Le logiciel Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corp, Redmond, WA) a été utilisé pour le traitement des données brutes provenant d'ISIS ainsi que pour les analyses statistiques. Le logiciel Graphpad Prism 5 (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA) a été utilisé pour la conception des graphiques.

RÉSULTATS

3.1 Traitement des spécimens de la chirurgie aux analyses

Les analyses ont été effectuées sur 11 spécimens provenant de résections chirurgicales de tumeurs cérébrales de 11 patients traités au CHUS. Pour chaque échantillon, la même procédure a été suivie (Figure 13).

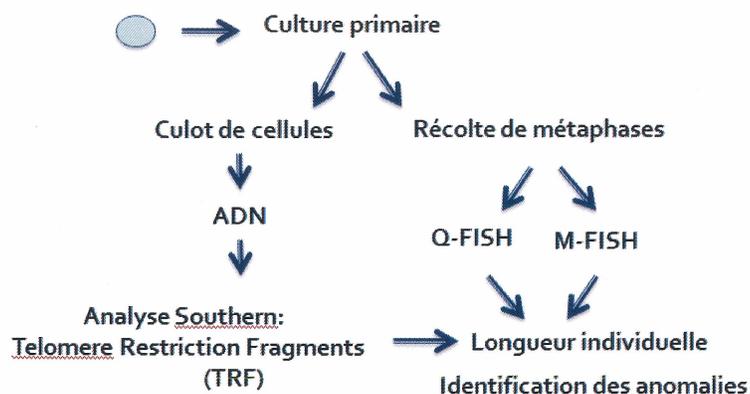


Figure 13. Schéma général des manipulations effectuées à partir des spécimens tumoraux.

Les spécimens analysés proviennent de 5 femmes et 6 hommes caucasiens, âgés entre 25 et 72 ans. L'âge moyen est de 50,4 ans et l'âge médian de 51,5 ans. La moyenne du temps de survie après chirurgie est de $22,9 \pm 13,9$ mois pour l'ensemble des spécimens analysés. Les numéros attribués à chacun des spécimens ont été donnés en fonction de l'ordre d'arrivée des échantillons et non en fonction de critères spécifiques. Les données cliniques des patients sont décrites dans les résultats de chacun des spécimens et à l'annexe 1. Celles-ci proviennent des dossiers médicaux des patients ayant été traités au CHUS. Toutes les informations, telles que les chirurgies supplémentaires ou le décès de patients enregistrés dans un autre hôpital que le CHUS et non-rapportés dans le dossier par le médecin traitant, ne sont pas disponibles. Le diagnostic des tumeurs est établi par le neuropathologiste du CHUS selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Un des spécimens s'est avéré être un astrocytome avec changements anaplasiques (grade III) plutôt qu'un GBM. Les résultats de ce spécimen sont tout de même présentés dans le document.

Le contrôle positif utilisé est la lignée cellulaire adhérente U-87 MG (American Type Culture Collection, Masassas, VA) provenant d'une tumeur astrocytaire agressive humaine de grade IV. La lignée cellulaire a été manipulée de la même façon que les cellules de spécimens humains.

Les longueurs moyenne et individuelle des télomères ont été mesurées sur les cellules en culture de chaque spécimen. Afin de réduire le biais de sélection clonale et de diminution de la longueur télomérique, les cellules ont été cultivées pour un maximum de six passages avant d'être récoltées ou congelées. Les spécimens ont été récoltés pour le Q-FISH et le M-FISH et les culots de cellules ont été congelés et conservés pour la technique de TRF. Les résultats obtenus pour la longueur moyenne et pour les longueurs individuelles proviennent donc de cellules ayant subi le même temps de culture.

3.2 Longueur moyenne des télomères

La technique TRF a permis d'obtenir la longueur moyenne de tous les télomères dans chacun des spécimens. Les manipulations ont été effectuées au moins en duplicata, excepté pour les spécimens 5 et 11 où la qualité et la quantité du matériel ont limité la technique à une seule mesure. Les marqueurs de poids moléculaire (M) permettent de mesurer la longueur moyenne de chaque spécimen par densitométrie (Tableau 5) L'écart-type (σ) a été mesuré par la répétition de la technique. La figure 14 et le tableau 5 présentent les résultats et mesures obtenus pour les spécimens analysés. Dans ce projet, la moyenne de tous les spécimens cliniques analysés est de $6,1 \pm 3,5$ kb.

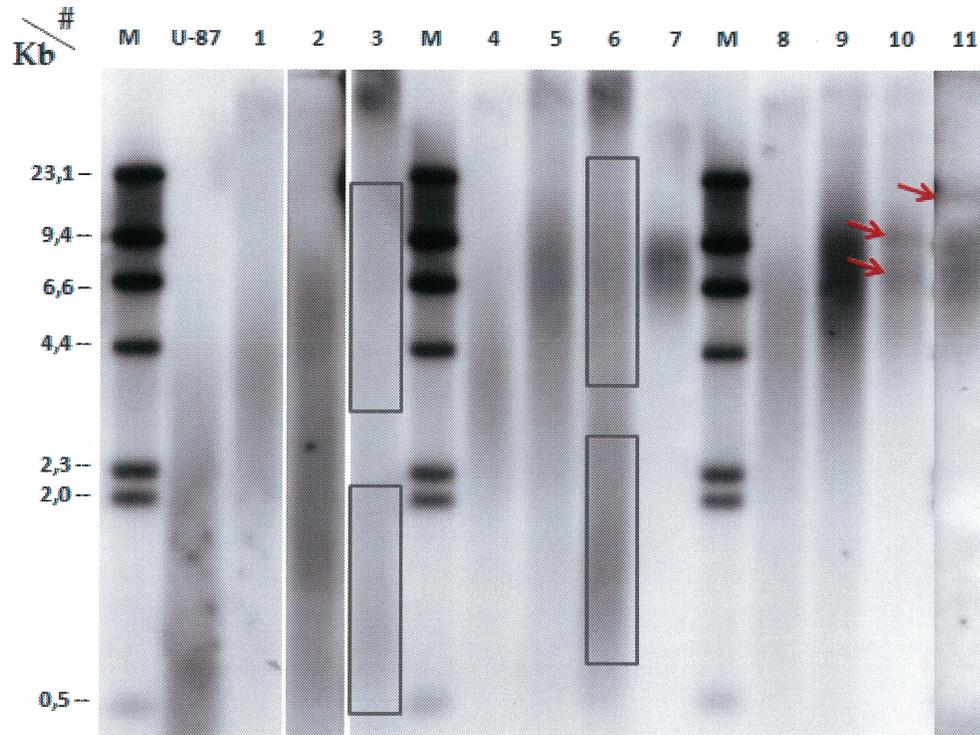


Figure 14. Analyse TRF pour chacun des spécimens. Chaque bande détectée correspond à la longueur des fragments de restriction correspondant aux télomères. Les chiffres correspondent aux numéros des spécimens analysés. Les spécimens 3 et 6 montrent chacun 2 bandes reliées à 2 «populations télomériques » (rectangles gris). Des bandes spécifiques sont détectées pour les spécimens 10 et 11 (flèches rouges).

Deux bandes diffuses de longueurs moyennes télomériques différentes sont observées dans les spécimens 3 et 6. Dans les deux cas, il s'agit de bandes avec une longueur inférieure à 1,5 kb et une supérieure à 7 kb (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). La longueur moyenne de chacune des bandes a été mesurée (tableau 5). La longueur individuelle relative a été établie avec la longueur moyenne totale mesurée par densitométrie. Les deux bandes ont été observées en triplicata pour le spécimen 3 et en duplicata pour le spécimen 6. Elles ont été caractérisées de « population télomérique ». Ces observations sont reproductibles ne peuvent pas être considérées comme étant une erreur technique ou un défaut de digestion lors des manipulations en laboratoire. Dans les deux cas de ces spécimens, les tumeurs avaient été caractérisées comme indolentes. Les

hypothèses concernant la présence de 2 bandes diffuses sont discutées en 4.2.3. Les bandes spécifiques des spécimens 10 et 11 sont décrits en 3.4 et discutées en 4.2.5.

Tableau 5. Longueurs moyennes des télomères obtenus suite à l'analyse TRF

Spécimen	Longueur TRF (kb) $\pm \sigma$
U-87 MG	0,95 \pm 0,08
1	2,60 \pm 0,10
2	2,60 \pm 0,00
3	1,30 \pm 0,10
3	10,20 \pm 0,10
4	3,65 \pm 0,15
5	6,90
6	1,45 \pm 0,05
6	7,45 \pm 0,05
7	9,10 \pm 0,10
8	4,75 \pm 0,25
9	8,80 \pm 0,00
10	10,35 \pm 0,04
11	10,60

3.3 Caryotypage des spécimens

Les caryotypes des spécimens ont été effectués avec les images obtenues par M-FISH. Pour chacun des spécimens, sept à douze cellules ont été caryotypées et analysées. Les cancers solides étant particulièrement hétérogènes, plusieurs variations peuvent être observées dans le nombre de chromosomes. La technique de Q-FISH permet d'obtenir une hybridation spécifique et quantitative des télomères tandis que le M-FISH nous permet une meilleure interprétation des caryotypes complexes obtenus dans les GBM. La mesure des signaux de Q-FISH pour chacune des extrémités chromosomiques nous permet d'obtenir une mesure individuelle des télomères et d'en faire une moyenne relative avec la longueur moyenne obtenue par TRF.

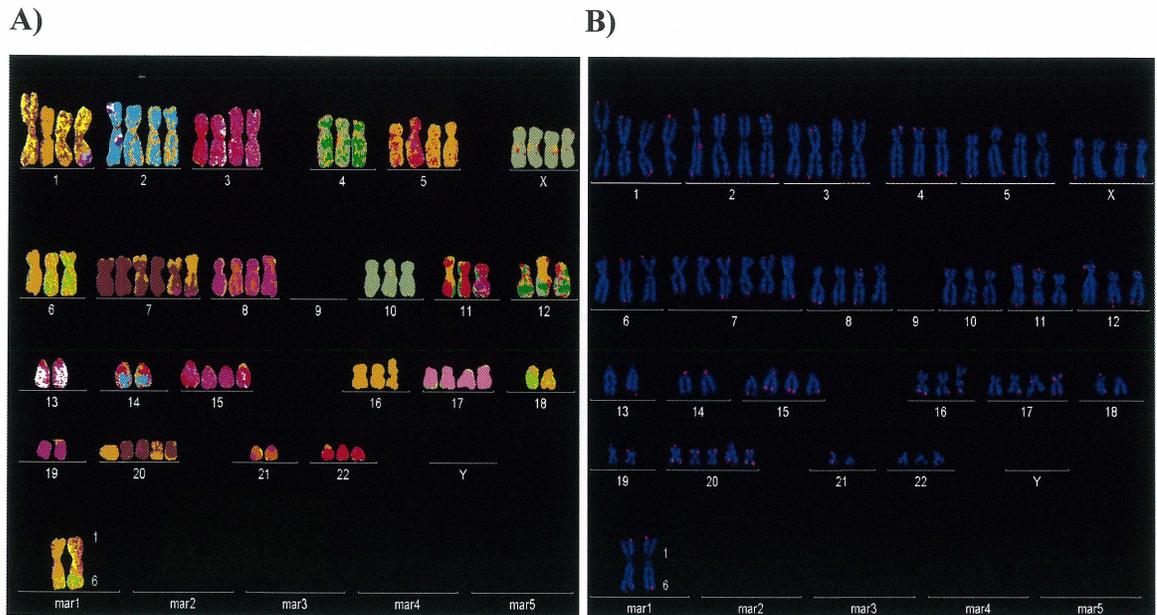


Figure 15. Exemple de caryotype particulier observé par M-FISH **A)** et Q-FISH **B)** pour une cellule du spécimen 1. Il s'agit d'une cellule hypertriploïde ($76,XXXX,+1,+der(1)t(1;6)(q?;?)x2,+2,+3,+5,+7,+7,+7,+8,-9,-9,-9,-13,-14,+15,+17,-18,-19,+20,+20,-21$).

Chaque caryotype a été analysé en fonction du nombre de chromosomes retrouvés (nombre modal de chromosomes) et selon les anomalies de structures (tableau 7). Le tableau complet des anomalies recensées pour chacun des cas se trouve en annexe 3.

Tableau 6. Nombre de chromosomes et d'anomalies de structure retrouvé par mitose

Spécimen	Sexe	Chromosomes (n)	Anomalies de structure par mitose (n)
U-87 MG	Y	41-47; 83	7-14
1	F	38-77	1-6
2	Y	33-87	0
3	F	46	0
4	Y	61-78	1-4
5	Y	43-46; 72	0-1
6	F	46-47	14-18
7	Y	59-72	2-5
8	Y	28-122	3-12
9	Y	33; 44-47	0
10	F	43-46	0
11	Y	39-47; 92-93	0-1

3.4 Description des résultats individuels

Les anomalies de structure relatives à chacun des spécimens sont détaillées dans l'annexe 3. Les anomalies chromosomiques sont décrites comme étant « récurrentes » lorsqu'observées dans plus de 40% des cellules analysées d'un même spécimen. Le seuil de 40% a été défini par le laboratoire. Les chromosomes ont été identifiés par M-FISH. Dans plusieurs cas, il était impossible d'identifier correctement le bras chromosomique impliqué dans l'anomalie. Les dérivés sont des chromosomes dont la structure a été réarrangée par plus d'un événement (c.-à-d., inversion et délétion sur un même chromosome) ou le produit d'un réarrangement impliquant 2 chromosomes ou plus (c.-à-d., le produit d'une translocation non équilibrée). Ces anomalies sont pour la plupart des produits de translocation et sont identifiés selon l'origine chromosomique du centromère présent dans le dérivé, par exemple, centromère du chromosome 1, bout du bras p échangé avec le p du chromosome 6 se nomme $der(1)t(1;6)(p22;p12)$ dans le U-87MG. La nomenclature des anomalies est faite selon les règles du système international de nomenclature pour la cytogénétique humaine (*An international System for Human Cytogenetic Nomenclature*, ISCN) (Shaffer and Tommerup 2005).

Les données brutes des longueurs individuelles des télomères de chacun des spécimens se retrouvent en annexe 2. Les profils des longueurs individuelles sont présentés sous forme de graphique (figures 15 à 26) avec une échelle de 15 kb, excepté pour les spécimens 7, 9, 10 et 11 ayant une échelle de 25 kb. Les longueurs moyennes décrites sont regroupées dans le tableau 5.

3.4.1 Spécimen U87-MG

Le spécimen (numéro ATCC : HTB-14TM) provient originalement d'un homme caucasien de 44 ans. Deux autres lignées cellulaires, ATCC HTB-15 et ATCC HTB-16, ont pour origine le même gliome malin. La lignée est déjà connue comme étant hypodiploïde, ayant un nombre modal de 44 chromosomes et un taux de ploïdie plus élevé de 5,9%. Un total de 12 anomalies chromosomiques communes ont été identifiées par ATCC : $der(1)t(1;3)(p22;q21)$, $del(9)(p13)$, $der(16)t(1;16)(p22;p12)$ et 9 autres anomalies. Selon les descriptions de l'ATCC, le dérivé du chromosome 1 est présent en 2 copies dans la plupart des cellules, un seul chromosome X est présent, le chromosome Y est manquant et il

semble qu'il n'y ait aucune copie normale (sans anomalies) des chromosomes 1, 6 et 9 (ATCC® 2012).

Les cellules analysées de la lignée U-87 MG possèdent entre 41 et 47 chromosomes et une seule cellule sur douze en possédait 83. Les caryotypes contiennent entre 7 et 14 anomalies de structure par cellule. La majorité des chromosomes est impliquée dans les anomalies chromosomiques sauf les chromosomes 5, 8, 11, 15, 21, X et Y. Les anomalies de structure récurrentes dans les cellules sont les

der(20)(20pter→20q?::1p?→1p?::14q?→14qter), der(7)(7pter→q?::6q?→6qter), der(1)(13qter→13q?::1p?→1qter), der(16)(1pter→1p?::16p?→16qter), der(22)(10qter→10q?::22p?→22qter) et le der(12)t(6;12)(?;q?).

On note, de façon récurrente, des délétions des chromosomes 1, 2 et 20 ainsi que des segments de chromosomes 6, 11q, 13, 14, et 18. Au niveau des amplifications fréquentes, on retrouve majoritairement des petits bras du 4 et une partie du 7 surnuméraires. Les chromosomes 1, 6, 12, 13, 22 et 14 sont particulièrement impliqués dans les réarrangements de structure. Les anomalies retrouvées pourront être comparées avec les données d'ATCC.

Le spécimen U87-MG présente une longueur moyenne de $0,95 \pm 0,8$ kb. Les longueurs relatives individuelles ont été calculées à partir de cette valeur (figure 16). La longueur moyenne des télomères est la plus petite de toutes ($0,95 \pm 0,08$ kb).

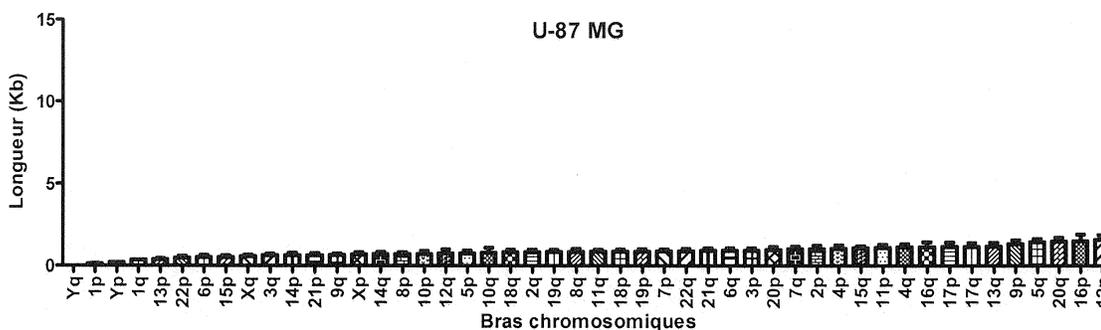


Figure 16. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères de la lignée cellulaire U87-MG.

3.4.2 Spécimen 1

Le spécimen 1 est une des tumeurs les plus agressives avec une survie courte. Il provient d'une tumeur d'une femme de 54 ans avec une survie de 4,3 mois après opération. La longueur moyenne des télomères de $2,60 \pm 0,1$ kb a servi à mesurer les longueurs individuelles (figure 17).

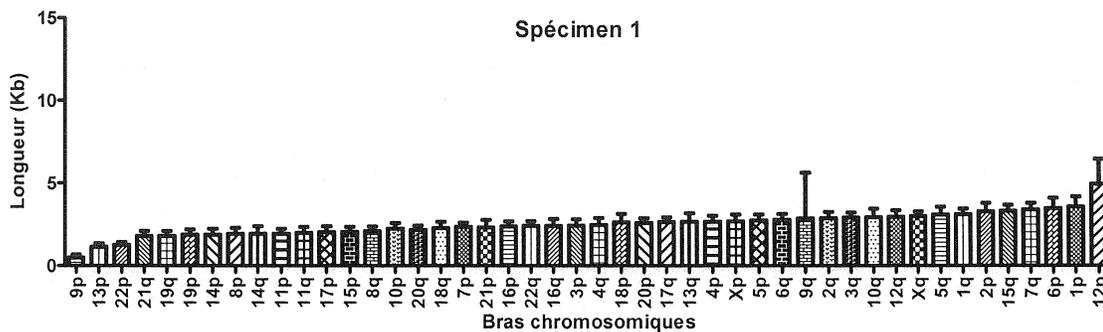


Figure 17. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 1.

Les caryotypes sont très hétérogènes. Ils présentent entre 38 et 77 chromosomes incluant 1 à 6 anomalies de structure par cellule. On y observe majoritairement des cellules hypertriploïdes (8/11) ayant une allure de caryotype tétraploïde avec de nombreuses délétions. Aucune cellule ne présente le même caryotype.

On retrouve fréquemment des délétions des chromosomes 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 21, 22 ainsi que des chromosomes 7 et 20 surnuméraires. On remarque parallèlement les 9p, 13p, 14p, 19q, 19p, 22p et 21q comme étant les plus courts du spécimen. Ce sont les chromosomes 1, 6, 9 et 18 qui sont majoritairement impliqués dans les dérivés identifiés. En comparant avec les longueurs individuelles, nous avons observé que le 9q présente une très grande hétérogénéité dans les différentes cellules et que l'on retrouve le 1p et 6p au niveau des télomères les plus longs. Le télomère 9p est le plus court et le plus souvent délété. Très peu de télomères 9q ont pu être mesurés.

3.4.3 Spécimen 2

Le spécimen 2 provient d'un homme de 41 ans avec une survie de 44 mois après la première chirurgie. La longueur moyenne ayant servis aux longueurs individuelles est de $2,60 \pm 0,10$ kb (Figure 18).

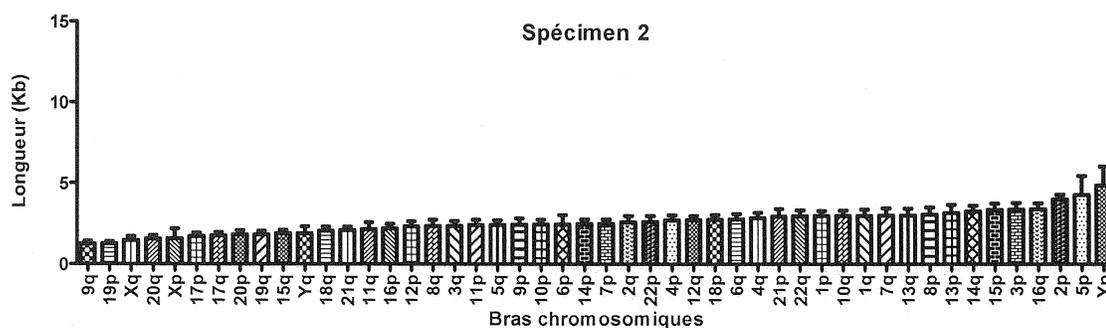


Figure 18. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 2.

Sur les dix caryotypes analysés, six possèdent 46 chromosomes (XY). Trois autres caryotypes possèdent 45, 33 et 87 chromosomes. Aucune anomalie de structure n'a été identifiée. On remarque une délétion des chromosomes 3 et 21 dans les cellules 45,XY et des délétions des chromosomes 1, 3, 13 et 1, 5, 6, 10, 14, 15, 16, 19, 21, 22 dans les deux autres cellules. Aucune de ses anomalies ne semble être caractéristique du spécimen et la tumeur a été caractérisée comme étant indolente.

3.4.4 Spécimen 3

Le spécimen 3 provient d'une femme de 39 ans. Il s'agit d'un des spécimens possédant deux « populations télomériques » ($1,30 \pm 0,1$ kb et $10,20 \pm 0,1$ kb). La longueur moyenne utilisée pour les longueurs individuelles a été définie par densitométrie à $6,30 \pm 0,04$ kb (Figure 19).

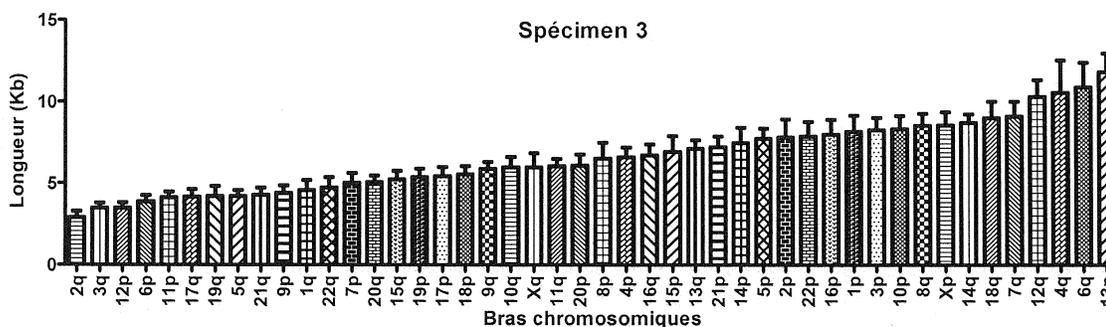


Figure 19. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 3.

Le spécimen 3 est un astrocytome avec changements anaplasiques. Ce dernier présente des caryotypes très homogènes (46,XX), sans anomalie de nombre ou de structure (annexe 3). Un total de 14 caryotypes normaux ont été analysés pour ce spécimen. La survie pour cette patiente fut de 14,3 mois. Cette tumeur a été caractérisée comme étant indolente.

3.4.5 Spécimen 4

Pour ce qui est du spécimen 4, la survie de la patiente (femme, 59 ans) était de 18,2 mois et la longueur moyenne des télomères de $3,65 \pm 0,15$ kb (Figure 20). Au niveau du caryotype, les cellules contiennent entre 61 et 78 chromosomes. Les cellules possèdent entre 1 à 4 anomalies de structure. Les chromosomes 2, 4, 7, 9, 11, 15, 17, 18, 21 et 22 sont impliqués dans ces anomalies dans au moins une cellule. Le der(9;22)(q10;q10) et le der(7;17)(q10;q10) sont les principales anomalies de structure observées.

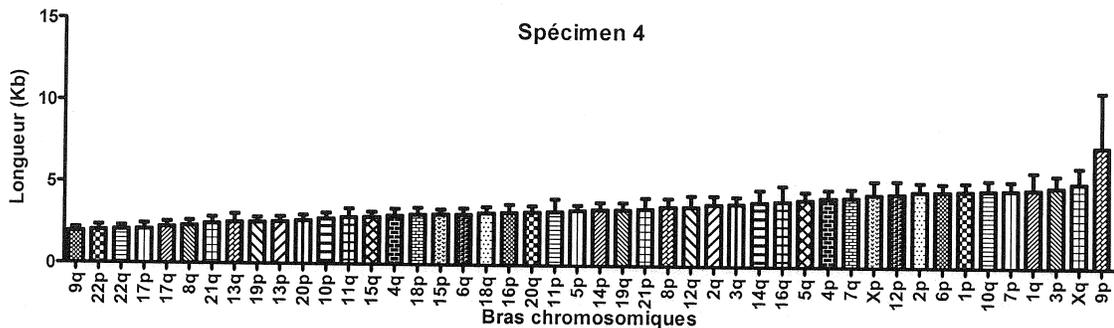


Figure 20. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 4.

Au niveau de la longueur individuelle, on remarque surtout le fait que le 9p soit le plus long et le 9q le plus court, en plus d'observer le 17p, 17q, 22p et 22q dans les plus courts. On remarque que tous les télomères des chromosomes impliqués dans les anomalies de structure font partie des télomères les plus courts, excepté pour le 9p qui est le plus long. Le caryotype est hypertriploïde. On peut noter par contre un nombre inférieur constant des chromosomes 9, 10, 11, 13, 14, 17, 22 et un nombre supérieur des chromosomes 1, 3, 6, 8 et 20. La délétion du 22 et les 1 et 20 surnuméraires ont déjà été documentés (Bleeker et coll. 2012; Dahlback et coll. 2009).

3.4.6 Spécimen 5

Le spécimen provient d'un homme de 43 ans. Les caryotypes présentent entre 43 et 46 chromosomes et une cellule de 72. Un seul caryotype possède un chromosome X surnuméraire et deux ont perdu leur chromosome Y. On retrouve trois différents caryotypes ayant perdu les chromosomes 5, 6, 7 et 8. Le caryotype de la cellule 72,XXYY semble être une cellule tétraploïde avec un grand nombre de délétions. Le temps de survie pour ce patient n'est pas disponible. Il s'agit d'un spécimen avec indice de prolifération Ki-67 élevé de 80% et une longueur télomérique moyenne normale de 6,90 kb (Figure 21). Deux différentes anomalies de structure ont été identifiées, le der(14;22)(q10;q10) et le der(6;17)(p10;?10). Au niveau de la longueur individuelle, on remarque le 22q est retrouvé dans les plus courts. Les autres anomalies retrouvées ne sont pas récurrentes.

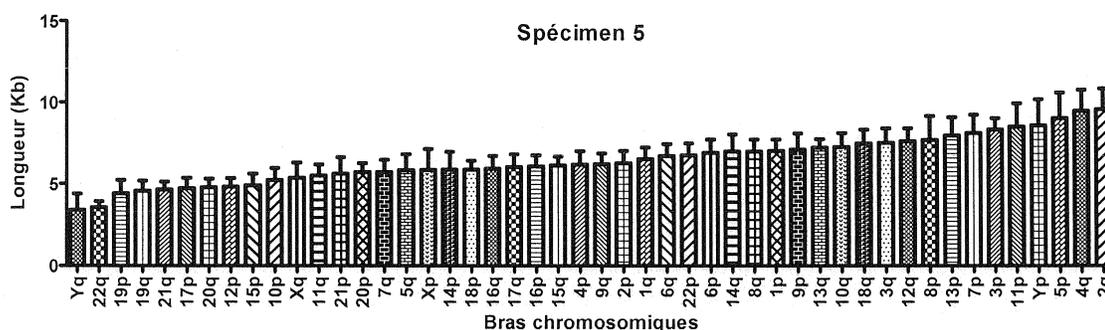


Figure 21. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 5.

3.4.7 Spécimen 6

Le spécimen 6 est un spécimen provenant de la 3^e opération de résection d'une femme de 62 ans. La survie après diagnostic est de plus de 36 mois mais la survie après chirurgie est de 3 mois. Le patient a subi deux traitements de chimiothérapie et de radiothérapie combinés (protocole Stupp). La tumeur a été décrite comme étant indolente. Il s'agit du 2^e spécimen à présenter deux « populations télomériques » différentes (1,45 et 7,45 ± 0,05 kb). Le profil de longueur individuelle a été défini par densitométrie à partir de la moyenne des bandes à 1,75 ± 0,05 kb (Figure 22).

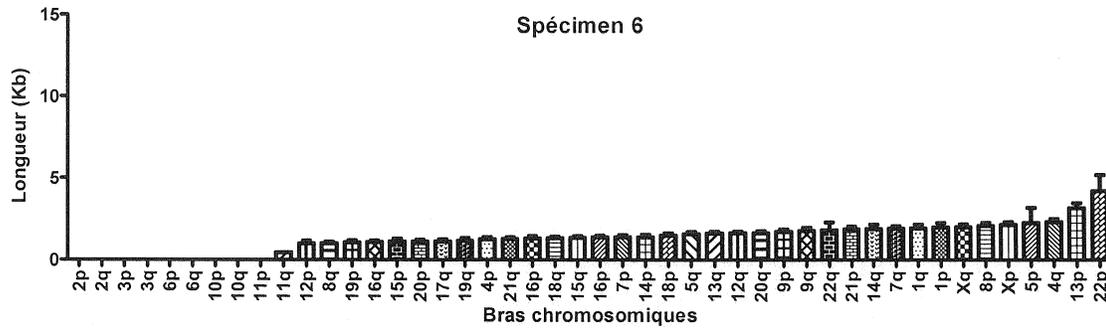


Figure 22. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 6.

Les caryotypes sont homogènes mais présentent de nombreuses anomalies de structure. Les caryotypes présentent 46 ou 47 chromosomes avec un total de 14 à 18 anomalies de structure par cellule. On note de façon récurrente des chromosomes 7 et X surnuméraires. La totalité des cellules montrent une délétion des chromosomes 1, 2(x2), 3(x2), 5, 6(x2), 8, 9, 10(x2), 11, 12, 15, 16 et 19. Les anomalies de structures récurrentes sont les suivantes : $der(1;5)(?10;q10)$, $der(1;5)(?10;p10)t(1;2)(?;?)$, $der(9)t(3;9)(?;?)$, $der(2)t(2;19)(p?;?)$, $der(3)t(3;2)(p?;?)t(2;6)(?;?)$, $der(3;10)(3? \rightarrow 3?10::10?10 \rightarrow 10qter)$, $der(6)(6pter \rightarrow 6q?::2? \rightarrow 2?::1? \rightarrow 1?)$, $der(11;12)(?10;?10)$, $der(19)t(?;19)(?;p?)$, $t(8;11)(p?;p?)$, $der(10;19)(?10;?10)$, $der(12;22)(?10;?10)$, $t(15,16)(p10;?10)$, $ins(3;9)(3pter \rightarrow 9?::?::9q? \rightarrow 3qter)$ et $r(2)(p?;p?)$.

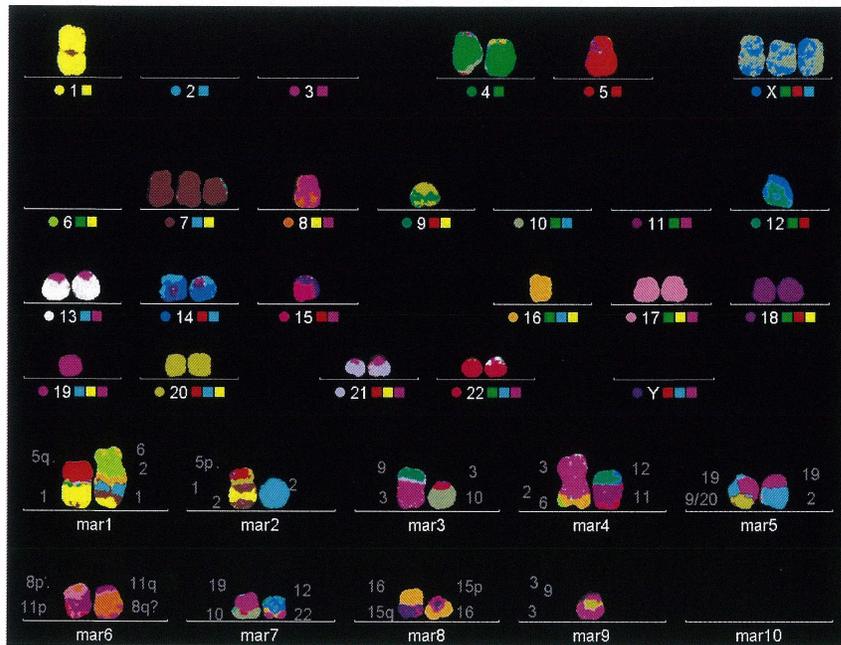


Figure 22. Caryotype de la cellule 1 du spécimen 6 représentant la complexité des caryotypes retrouvés. Ce caryotype est caractérisé par de nombreuses anomalies de structure (13 dérivés, 2 translocations et un anneau) (47,XXX,der(1;5)(?10;q10),-2, der(2)(3? \rightarrow 3? $::$ 2? \rightarrow 2? $::$ 6? \rightarrow 6?), del(2)(q?),der(2)t(2;19)(?10;?10),-3, ins(3;9)(3pter \rightarrow 3q? $::$ 9? \rightarrow 9? $::$ 3q? \rightarrow 3qter),der(3;9)(?10;?10),-5, der(5;1)(5p \rightarrow 5? $::$ 1? \rightarrow 1? $::$ 2? \rightarrow 2?),-6, der(6)(6p \rightarrow 6q? $::$ 2? \rightarrow 2? $::$ 1? \rightarrow 1?),+7,t(8;11)(p10;p10),-10, der(3;10)(?10;?10), der(11)t(11;12)(?;?),der(12)t(12;22)(?;?),t(15;16)(p?;?),der(19;20)(?10;?10), der(19)t(10;19)(?;?) .

Aucun lien ne peut être fait entre la longueur individuelle des télomères et les anomalies de structure identifiées. Le nombre de données recueillies pour ces chromosomes est trop faible étant donné que les bras chromosomiques n'ont pas pu être identifiés pour les chromosomes impliqués dans les translocations.

3.4.8 Spécimen 7

Le spécimen d'un homme de 25 ans présente une survie de 5,5 mois (le plus agressif). Les caryotypes possèdent entre 59 et 72 chromosomes. On retrouve le der(9)t(9;15)(q;p?) et une autre anomalie impliquant le bras long du chromosome 17 dans toutes les cellules analysées (annexe 3). Les télomères 9q et 17p se trouvent dans les plus courts retrouvés dans le spécimen. On retrouve sept des huit caryotypes hypotriploïdes avec

des ratios de chromosomes variant encore entre 2 et 4 dans les mêmes cellules. On note les duplications des chromosomes 1, 7 et 8 et des délétions des 2, 6, 9, 10, 13, 14, 15p et 22. Les longueurs individuelles sont calculées à partir de la longueur $9,10 \pm 0,10$ kb (figure 24).

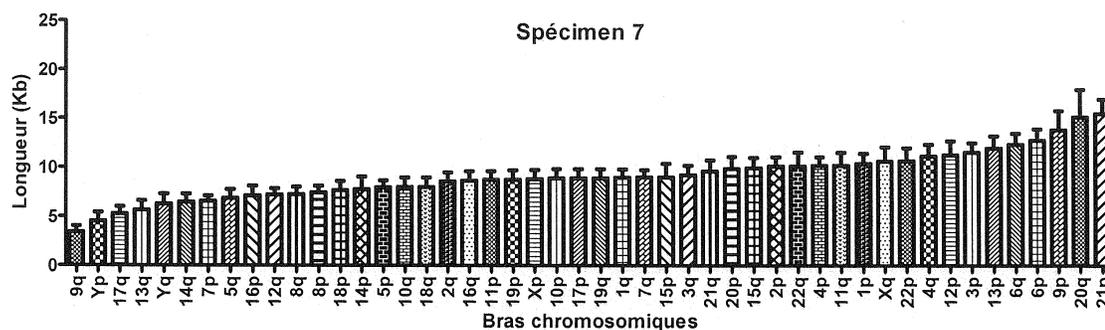


Figure 23. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 7. L'échelle de longueur a été établie à 25 kb.

3.4.9 Spécimen 8

Le spécimen 8 provient d'un homme de 49 ans avec une survie de moins de 12 mois après opération. L'échantillon provient de la 2^e chirurgie du patient et l'information concernant les traitements de chimio et radiothérapie ne sont pas disponibles. La longueur moyenne de $4,75 \pm 0,25$ kb a été utilisée pour le schéma de longueurs individuelles (Figure 25).

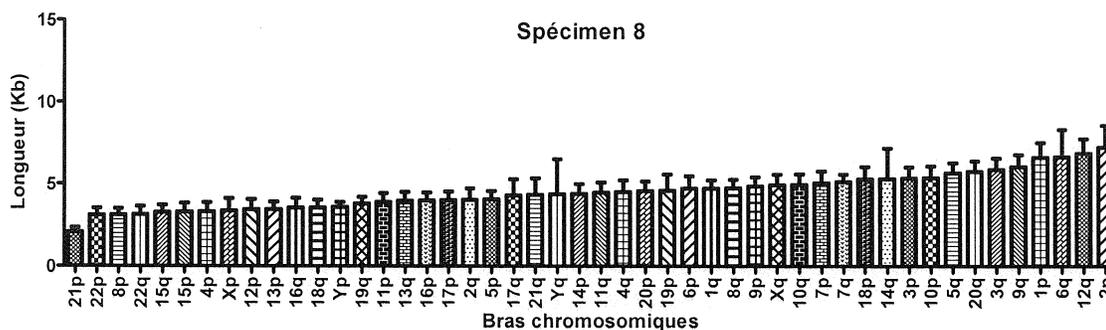


Figure 24. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 8.

Les caryotypes analysés présentent une très grande hétérogénéité (de 28 à 122 chromosomes par cellule). On retrouve entre 3 et 12 anomalies de structure par cellule mais seuls les $\text{der}(1;9)(\text{p}10;?10)$, $\text{der}(12;21)(?10;?10)$ et le $\text{der}(X;21)(?10;?10)$ sont récurrents. Cette hétérogénéité cellulaire semble être causée par la mauvaise ségrégation des chromosomes à la mitose, causant des cellules avec des nombres inégaux de chromosomes. Le télomère 21p est le plus court du spécimen et le 12q le plus long.

3.4.10 Spécimen 9

Le spécimen 9 provient de la première opération d'un homme de 72 ans qui était toujours en vie 19 mois après sa chirurgie. La longueur moyenne du spécimen est de $8,80 \pm 0,0$ kb (Figure 26). Les caryotypes analysés contiennent de 44 à 47 chromosomes, la plupart sans anomalie de structure. Une seule cellule contenait 4 anomalies impossibles à identifier. Seul le chromosome 11 s'est présenté comme étant supplémentaire dans une cellule et les chromosomes 15, 10 et 22 sont délétés dans 2 cellules. Le Y est absent dans trois cellules.

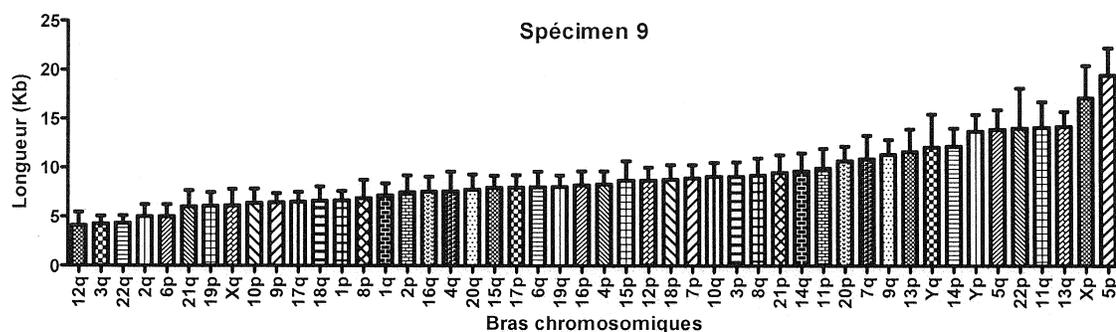


Figure 25. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 9. L'échelle de longueur est établie à 25 kb.

3.4.11 Spécimen 10

Ce spécimen provient de la première de trois opérations de résection d'une femme de 58 ans. Aucune anomalie de structure n'y est observée mais certains chromosomes et

bras chromosomiques sont perdus dans quatre cellules (délétions respectives du 9p, 13, 19 et 21, 2, 17 et 21). La longueur moyenne des télomères est normale avec $10,35 \pm 0,04$ kb (Figure 27) et la survie du patient est de plus de 35 mois. Il s'agit d'un des spécimens ayant des bandes spécifiques au niveau du TRF (section 4.4.4). Aucun lien avec la longueur individuelle ne peut être fait.

Les deux bandes spécifiques présentes dans le spécimen 10 se trouvent à l'intérieur de la bande diffuse. En comparant les résultats obtenus pour les longueurs individuelles de ce spécimen, il est possible d'observer deux plateaux pouvant correspondre à ces deux bandes spécifiques (figure 13). Ces plateaux englobent chacun entre 7 et 10 télomères, pouvant expliquer les lignes spécifiques. (Figure 26)

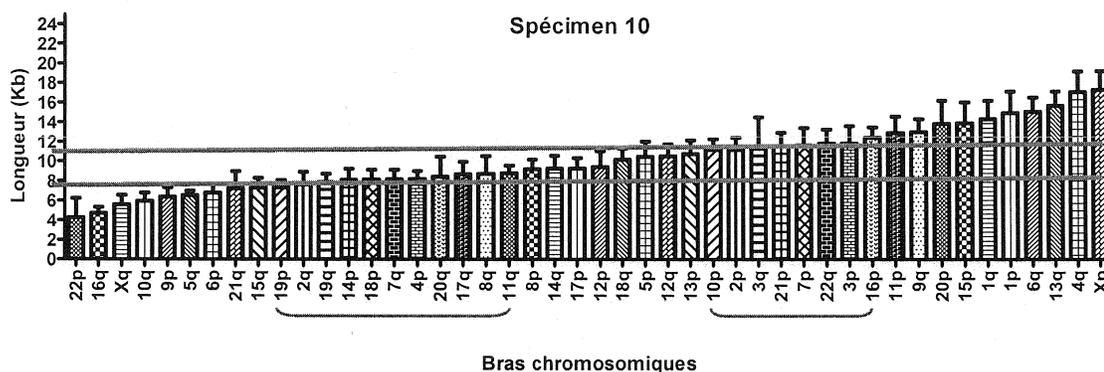


Figure 26. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 10. L'échelle de longueur est établie à 25 kb. Deux plateaux de longueurs télomériques identifiés dans le spécimen 10 correspondant aux deux bandes spécifiques identifiées par la technique de TRF .

3.4.12 Spécimen 11

Le dernier spécimen analysé provient d'un homme de 54 ans et est caractérisé par une longueur moyenne normale de 10,60 kb (Figure 26) et une survie de 25 mois. Les caryotypes montrent un nombre de chromosomes hypodiploïde à hypertétraploïde allant de 39 à 47 chromosomes, plus deux cellules avec 92 et 93 chromosomes respectivement. Seul le bras chromosomique 4p et un anneau du chromosome 2 sont surnuméraires. Aucune anomalie de nombre ou de structure n'a été identifiée comme étant récurrente.

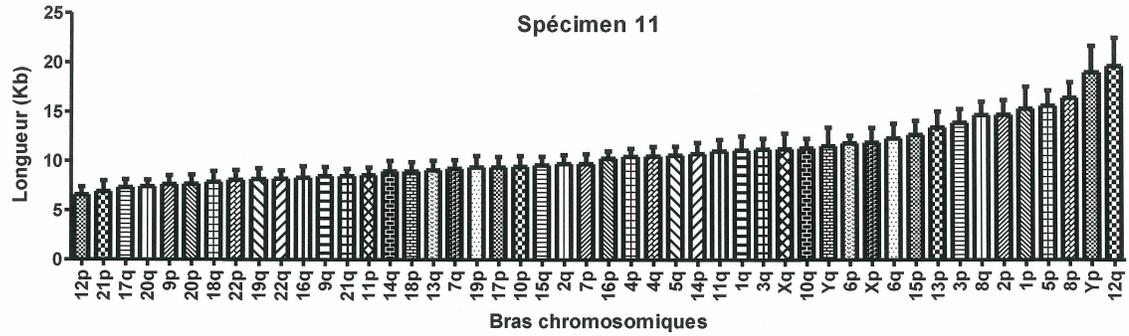


Figure 27. Profil des longueurs relatives individuelles des télomères du spécimen 11. L'échelle de longueur est établie à 25 kb.

Ce spécimen possède une bande spécifique dans l'analyse TRF. Il s'agit d'une bande correspondant à des télomères plus longs que les autres retrouvés dans la bande diffuse. Pour ce spécimen, en observant le graphique et les moyennes des longueurs individuelles des télomères (figure 27; annexe 2), il est possible d'observer le télomère 12q comme étant définitivement plus long que les autres. Le signal plus intense au niveau du 12q peut aussi être observé au niveau du Q-FISH (figure 28). L'analyse détaillée se trouve en 4.2.5.

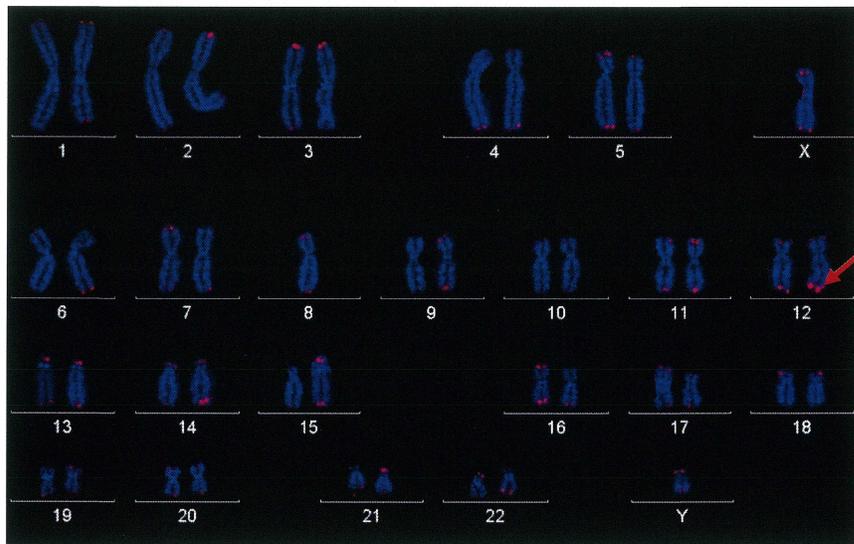


Figure 28. Caryotype en Q-FISH d'une cellule du spécimen 11. On observe un signal d'intensité plus marquée au chromosome 12q.

3.5 Télomères significativement différents dans les GBM

Les longueurs relatives individuelles des télomères ne nous offrant pas une distribution de type gaussien, les télomères les plus longs et les plus courts ont été établis selon leurs percentiles. Les télomères se trouvant dans les percentiles supérieurs à 97,5 et inférieurs à 2,5 ($p=0,05$) ont été considérés comme significativement plus longs et plus courts dans chacun des spécimens. Les graphiques indiquant les télomères significativement différents de la moyenne se trouvent en annexe 4.

Tableau 7. Télomères considérés comme significativement différents de la moyenne

Télomères	Spécimens											
	U-87 MG	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Plus courts (percentiles $\leq 2,5$)	1p	9p	9q	2q	22p	22q	11q	9q	21p	3q	22p	12p
	Yp	13p	19p	3q	9q	Yq		Yp	22p	12q	16q	21p
		22p		12p								
Plus longs (percentiles $\geq 97,5$)	12p	12p	5p	13p	Xq	2q	22p	20q	12q	Xp	4q	Yp
	16p		Yp	6q	9p	4q		21p	2p	5p	Xp	12q

Nos résultats montrent des longueurs moyennes variant de 0,95 à 10,6 kb. L'hétérogénéité dans la longueur est bien illustrée par les résultats de longueur individuelle des télomères indiquant que la grande variation retrouvée entre les télomères les plus courts et les plus longs (tableau 7; annexe 2). En observant les télomères significativement plus courts que la moyenne, on retrouve les télomères des 1p, 2q, 3q, 9p, 9q, 11q, 13p, 16q, 12p, 12q, 19p, 21p, 22p, 22q, Yp et Yq. Pour ce qui est des télomères longs, on note les 2p, 2q, 4q, 5p, 6q, 9p, 12p, 12q, 16p, 20q, 21p, 22p, Xp, Xq et Yp. Les télomères 2q, 9p, 12p, 12q, 21p, 22p et Yp sont retrouvés dans les 2 catégories de longueurs. Ces résultats sont discutés à la section 4.2.2.

Tableau 8. Variations entre les télomères les plus courts et les plus longs

Spécimen	Longueur moyenne (kb)	Télomère le plus grand (kb)	Télomère le plus petit (kb)	Variation (kb)	Variation (%)
U-87 MG	0,95	1,6	0,1	1,5	94%
1	2,6	4,9	1,1	4,8	78%
2	2,6	4,8	1,2	2,6	75%
3	6,3	11,8	2,9	8,9	75%
4	3,65	5,2	2,0	3,2	62%
5	6,9	9,6	3,4	6,2	65%
6	1,75	4,2	0,4	3,8	90%
7	9,1	15,5	3,4	12,1	78%
8	4,75	6,8	2,1	4,7	69%
9	8,8	19,4	4,1	15,3	79%
10	10,35	17,3	4,2	13,1	76%
11	10,6	19,6	6,6	13,0	66%

On remarque que les variations relatives (Tableau 8) à chacun des cas entre le télomère le plus long et celui le plus court varie entre 1,5 et 15,3 kb. Le pourcentage de variation a été calculée à partir de la différence entre le plus court et le plus long divisé par la longueur maximale (longueur la plus élevée). Celui-ci varie entre 62 et 94% de la valeur totale, représentant la grande hétérogénéité dans les longueurs expliquant les bandes diffuses retrouvés dans l'analyse TRF.

Les résultats des télomères significativement différents sont présentés dans le tableau 7. Ces résultats sont analysés selon les données de la survie après diagnostic et après chirurgie. Nous avons considéré que les spécimens 1, 6 et 7 ont des survies courtes, les 3, 4, 8 et 9 ont une survie intermédiaire et que les spécimens 2, 10 et 11 ont une survie longue. La lignée U-87 MG a été définie comme agressive étant donné sa grande prolifération. Les données cliniques du spécimen 5 ne sont pas disponibles.

L'analyse des télomères significativement courts et longs est présentée selon la comparaison entre les résultats obtenus dans les GBM, les LMC et les cellules normales (sections 1.3 et 4.3). Les gènes dont l'implication dans les GBM a été rapportée sont réunis dans le tableau 3.

Nous avons observé certains télomères **courts** dans plus d'un spécimen de GBM, sans être normalement courts dans les cellules normales ou les LMC :

- Le **9q** est présent dans les spécimens 2 et 7, ayant des survies respectives différentes de 44 et 5,5 mois.
- Le **3q** présent dans les spécimens 3 et 9, ayant une survie de 14,3 mois et plus de 19 mois.

Certains télomères normalement **longs** sont aussi **longs** dans certains GBM :

- Le **4q** est retrouvé long dans les spécimens 5 et 10 (survie non-disponible, 35,6 mois).
- Le **Xp** dans les spécimens 9 et 10 (14,3 et 35,6 mois).
- Le **5p** dans les spécimens 2 et 9 (44 et 14,3 mois).

La majorité de ceux-ci sont observés dans des tumeurs avec survie longue, suggérant que le maintien du patron de longueur peut améliorer la longévité des patients. Ces trois télomères sont aussi longs dans les LMC.

Certains télomères normalement **courts** sont aussi **courts** dans certains GBM :

- Le **19p** est court dans le spécimen 2 (44 mois).
- Le **12p** dans les spécimens 3 et 11 (14,3 et 25 mois)
- Le **16p** dans les U-87 MG.

Ces télomères courts ont conservé leur position dans le profil des longueurs des télomères mais ne semblent pas avoir d'effet sur la survie.

Certains télomères sont retrouvés à la fois **courts et longs** dans différents spécimens. Ces observations peuvent nous diriger vers différents phénomènes distincts selon le stade d'évolution du cancer.

- Le **21p** court est observé dans les spécimens 8 et 11, de survie intermédiaire et longue. Cette observation a aussi été faite dans les LMC. Ce même télomère est observé comme étant long dans le spécimen 7. Ce spécimen, avec une survie courte de 5,5 mois après la première opération, est considéré comme une tumeur très agressive. Le raccourcissement du 21p pourrait être considéré comme un événement important dans la cancérogenèse, mais non exclusif à l'agressivité tumorale.

- On remarque aussi que le télomère **22p** revient à 4 reprises dans les plus courts (spécimens 1, 8, 4 et 10) et une fois dans les plus longs (spécimen 6). Les spécimens avec un 22p court ont des survies respectives très variables de 4,3 à 35,6 mois. Le spécimen 6, avec une survie de 36 mois après diagnostic et 3 mois après opération, possède un 22p beaucoup plus long. Dans les cellules normales, le 22p ne se retrouve pas parmi les télomères les plus courts, tandis que, dans les cellules de LMC, le 22p se retrouve parmi les plus courts (figure 8). Ces observations nous permettent de proposer l'hypothèse que le raccourcissement du 22p est un évènement qui peut être exclusif au processus de cancérogenèse et que la conservation de la longueur de ce télomère pourrait favoriser une survie plus longue. Il faut noter que le spécimen 6, ayant une survie longue après diagnostic et un 22p long, possède une très grande quantité d'anomalies chromosomiques (14 à 18 par cellule), pouvant expliquer la survie très courte après chirurgie très courte.

Le télomère **9p** est court dans le spécimen 1 (survie 4,3 mois) et long dans le spécimen 4 (18,2 mois). Celui-ci n'était pas significativement différent dans les cellules normales ni dans les LMC.

Plusieurs observations ont été faites sur les spécimens de GBM et seront discutés dans la prochaine section.

DISCUSSION

4.1 Spécimens observés

La lignée cellulaire U87-MG a été utilisée comme contrôle positif. La disponibilité d'un contrôle négatif sera discutée en 4.1.2.2.

4.1.1 Spécimens cliniques

La survie après chirurgie des 11 spécimens est prise en compte dans la présente étude étant donné que les longueurs relatives des télomères sont mesurées à partir des spécimens obtenus lors la résection chirurgicale de la tumeur. La survie après le diagnostic correspond à la survie suite à la première chirurgie. Celle-ci varie seulement lorsque le spécimen analysé correspond à une 2^e ou 3^e chirurgie. La moyenne de survie de nos spécimens ($22,9 \pm 13,9$ mois) est supérieure à la moyenne de survie actuelle de 14,6 mois avec traitement de chimiothérapie et radiothérapie en concomitance (Stupp et coll. 2005). Aucune relation entre l'indice de prolifération Ki-67 et la survie des patients ne peut être faite. L'absence de corrélation entre ces deux variables a déjà été décrite dans une étude précédente de notre groupe (Gadji et coll. 2010). Il est possible d'observer que les patients ayant un temps de survie plus élevé que 18,2 mois ont été exposés à un plus grand nombre de traitements de chimiothérapie et de radiothérapie (annexe 1). Cette observation peut être reliée au temps de survie et à la moins grande agressivité du cancer du patient, accordant les conditions favorables à la poursuite des traitements. Les patients ayant eu une tumeur très agressive ont une survie inférieure à 12 mois tandis que trois patients sur quatre ayant une tumeur décrite comme étant indolente ont une survie supérieure à 35 mois (annexe 1). Les notes sur l'agressivité de la tumeur ont été faites au dossier du patient par le neurochirurgien traitant.

L'âge moyen des patients dont les spécimens proviennent ont un âge moyen de 50,4 ans, près de 10 ans sous l'âge moyen des personnes atteintes de gliomes en Amérique du Nord (Dolecek et coll. 2012). Considérant le raccourcissement des télomères avec l'âge, l'utilisation de patient plus jeune pourrait avoir inséré un biais dans les résultats. D'autres parts, le raccourcissement maximal estimé dans une vie pour les fibroblastes est de 1,5 Kb et de 0,88 Kb pour la matière blanche. L'écart pouvant être

causé par l'âge au niveau des cellules du cerveau peut être considéré comme beaucoup moindre que l'écart pouvant être retrouvé dans les longueurs des télomères héritées à la naissance des individus (Alsoop et coll. 1992; Graakjaer et coll. 2004; Kappei and Londono-Vallejo 2008; Takubo et coll. 2002). De plus, il a été démontré que les individus héritant de télomères plus courts à la naissance ont plus de susceptibilité à développer une pathologie causée par l'instabilité chromosomique (Nakamura et coll. 2007). L'importance du biais relatif à la perte télomérique due à l'âge avant l'augmentation de la prolifération cellulaire due à l'évolution du cancer est difficilement mesurable.

4.1.2 Lignées contrôle

4.1.2.1 Contrôle positif

La lignée cellulaire U-87 MG a été utilisée comme contrôle positif étant donné qu'elle provient d'une tumeur astrocytaire agressive humaine de grade IV et que cette lignée est fréquemment utilisée dans les laboratoires étudiant le GBM (Clark et coll. 2010). Les cellules U-87 MG représente un modèle de cellules hautement prolifératives ayant une grande quantité d'anomalies chromosomiques identifiées. Les techniques de cultures sont établies dans notre laboratoire depuis déjà quelques années.

Le génome de la lignée a été séquencé et publié en 2010 (Clark et coll. 2010). Le séquençage du génome a permis d'identifier 512 gènes avec mutation homozygote, dont 154 par microdélétions et 35 par translocations (Clark et coll. 2010). Cette lignée cancéreuse immortalisée sert de contrôle positif comme tumeur agressive.

Avec des caryotypes montrant entre 7 et 14 anomalies de structure par cellule, cette lignée est le 2^e échantillon avec le plus grand nombre de chromosomes réarrangés parmi les spécimens présentés dans ce mémoire. Plusieurs chromosomes dérivés de translocations sont présents dans une grande proportion des cellules. Cette observation indique que ces aberrations sont favorables à la prolifération de ces cellules en culture. Les anomalies indiquées par l'ATCC n'ont pas toutes été identifiées dans les caryotypes. Il est possible d'avoir fait une sélection clonale de ces cellules selon les conditions de nos manipulations en laboratoire.

Les données obtenues pour la lignée en comparaison avec celles de l'ATCC nous ont permis d'observer des similarités. Tel que décrit par ATCC, les chromosomes 1 et 6 normaux sans réarrangement ne sont pas retrouvés, la délétion du Y est présente dans 67% des cellules analysées et les dérivés impliquant les chromosomes 1 et 16, la délétion du bras court du 13 ainsi que le $\text{der}(16)t(1;16)(p22;p12)$ sont observées.

D'un autre côté, les cellules analysées ne possèdent pas toutes un nombre modal de 44 chromosomes tel que décrit par l'ATCC et certaines anomalies sont différentes de celles décrites. Une sélection clonale par la culture cellulaire peut expliquer les différences entre les observations de la compagnie et celles obtenues. De plus, les anomalies chromosomiques dans la lignée cellulaire initiale ne sont pas toutes décrites par la compagnie. Les variations observées dans notre spécimen représentent davantage l'hétérogénéité retrouvée dans le GBM. La lignée cellulaire U-87MG est un contrôle positif intéressant, car cette lignée est fréquemment utilisée dans les laboratoires de recherche sur le GBM et a été utilisée dans plus de 1 700 publications dans les 40 dernières années (Clark et coll. 2010). L'utilisation d'autres lignées cellulaires ayant des caractéristiques génétiques différentes comme contrôle positif pourrait renforcer la comparaison entre les spécimens cliniques et les lignées cellulaires.

4.1.2.2 Contrôle négatif

Pour plusieurs raisons, aucun contrôle négatif de cellules gliales n'a pu être obtenu. Le laboratoire n'a pas eu la possibilité d'obtenir un échantillon de tissu de parenchyme cérébral sain. Un échantillon de cerveau pourrait être utilisé afin d'obtenir la longueur moyenne des télomères par TRF, mais ne pourrait pas permettre la mesure de la longueur individuelle par Q-FISH. Cette dernière technique nécessite des chromosomes en métaphases provenant de cellules en division. Le taux de prolifération des cellules du cerveau étant extrêmement faible, il est impossible d'obtenir des cellules gliales en métaphase. Pour les futures analyses accomplies par le laboratoire, un échantillon sanguin pourrait être obtenu des patients participant à la recherche et permettrait d'obtenir des éléments de comparaison pour les longueurs individuelles provenant d'un même individu. Sachant que le patron de longueur individuelle est conservé chez un individu (Kappei and Londono-Vallejo 2008) mais que la longueur moyenne des télomères est différente entre

les différents tissus (Takubo et coll. 2002), la comparaison avec les cellules du sang serait intéressante pour observer le profil même s'il ne serait pas totalement représentatif de la longueur des télomères dans les parties saines du cerveau.

La mesure de la longueur moyenne des télomères ainsi que le Q-FISH télomérique a été effectué sur des astrocytes normaux (Human Astrocytes, ScienCell, Carlsbad, CA). Les résultats obtenus ont montré que ces cellules sont difficiles à cultiver et que leur génome devient rapidement instable (figure 28a). La longueur moyenne des télomères supérieure à 23 kb et la présence d'un nombre anormal de chromosomes nous ont convaincu de ne pas utiliser ces cellules comme contrôle négatif. La présence de télomères interstitiels nous indique que certains chromosomes ont probablement subi des cassures bicaténares qui ont été réparées par fusion des extrémités non-homologues (*non-homologous end-joining*, NHEJ) (Paques and Haber 1999). Les données provenant de ces cellules n'ont donc pas été utilisées comme contrôle négatif dans notre projet.

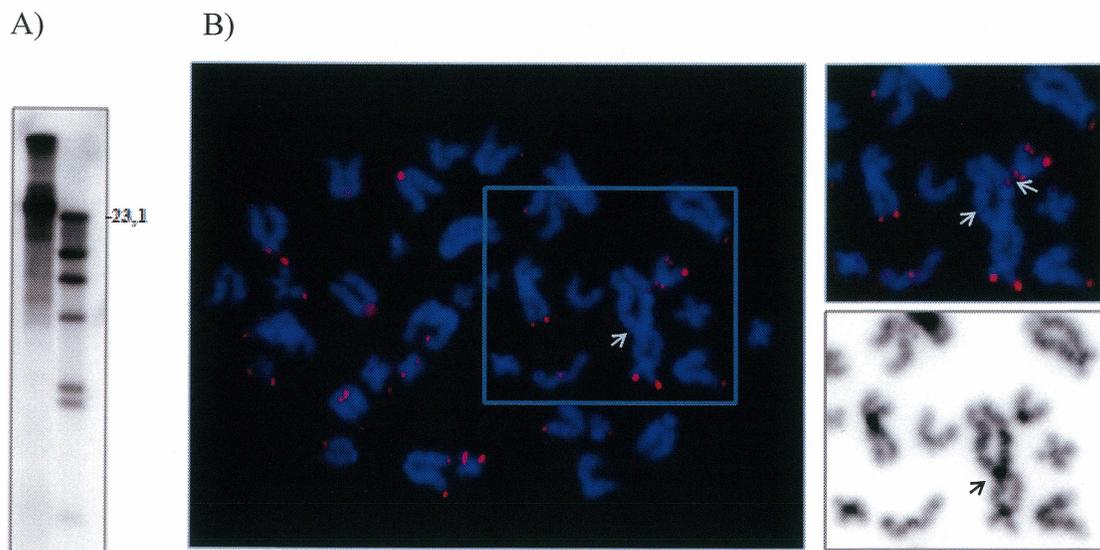


Figure 299. Analyse des astrocytes humains comme contrôle négatif. Panneau A) Métaphase présentant des télomères interstitiels. Panneau B) Analyse Southern de la longueur moyenne des télomères.

L'instabilité observée est probablement causée par un trop grand nombre de passage des cellules, des variations dans les conditions de culture recommandées ou

encore une mauvaise résistance aux étapes de préparation des cellules en métaphase. Il pourrait être intéressant de reprendre l'expérience avec les mêmes cellules ayant un nombre de passage moins élevé ou avec des astrocytes humains provenant d'autres compagnies.

4.2 Longueur des télomères

Les bandes normalement analysées par TRF dans des tissus sains sont bien définies et possèdent des longueurs moyennes variant de 9 à 13 kb (Alsopp et coll.). La longueur retrouvée dans le cerveau a été définie de 9,4 à 13,2 kb (Hiraga et coll. 1998; Kheirollahi et coll. 2011) et celle de la matière blanche, à $11,4 \pm 2,1$ kb (Nakamura et coll. 2007). Dans ce projet, les bandes des TRF des spécimens de GBM sont très diffuses et variables comparativement à celles décrites dans l'analyse de lymphocytes normaux, qui, normalement, présentent des bandes plus définies. La mesure de la longueur moyenne implique que cette valeur peut être moins représentative de l'ensemble des chromosomes lorsque les bandes sont très diffuses. La technique de mesure s'avère donc moins précise avec les cellules cancéreuses qu'avec des cellules saines, laissant des bandes beaucoup plus marquées avec la technique TRF. L'étude des télomères individuels en parallèle permet d'obtenir davantage d'informations sur l'augmentation de la variation de la longueur des télomères dans le cancer.

La mesure de la longueur individuelle des télomères a permis d'établir des graphiques correspondant à des profils individuels de longueurs pour chaque spécimen analysé. Le profil de longueurs individuelles et l'identification des télomères constitutivement longs et courts ont été définis par Samassekou et coll (2011). Le profil a été identifié dans des lymphocytes normaux et comparés au profil des LMC. En comparant avec le profil de longueur normal de Samassekou et coll, des graphiques correspondant au déplacement des télomères constitutivement courts et longs ont été produits (annexe 4).

4.2.1 Raccourcissement de la longueur moyenne

En s'appuyant sur les données décrites dans la littérature concernant la longueur moyenne des télomères, les valeurs obtenues par TRF devraient se trouver entre 8,5 et 14 kb et plus précisément à $11,4 \pm 2,1$ kb tel que retrouvé dans la matière blanche (Allsopp et coll. 1995; Kheirollahi et coll. 2011; Nakamura et coll. 2007; Takubo et coll. 2002). Les longueurs moyennes inférieures à 8,5 kb, tel que décrit par Kheirollahi et coll, sont considérées comme réduites (moyenne totale des spécimens analysés = $6,1 \pm 3,5$ kb). La longueur moyenne des télomères est diminuée fortement dans plus de 50% des tumeurs analysées.

Une longueur moyenne inférieure à 7 kb est considérée comme anormalement courte et les cellules ayant des télomères de cette longueur entrent normalement en sénescence (Baird et coll. 2003; Shay and Wright 2005). Dans nos échantillons, 8 sur 12 (incluant les U-87 MG), montrent des télomères raccourcis (figure 29). On peut remarquer que les spécimens 3 et 6 possèdent 2 valeurs de longueur moyenne reliées aux 2 bandes dans l'analyse TRF. Ce phénomène est discuté au point 4.2.3.

La présence d'un télomère trop court implique normalement l'entrée de la cellule en sénescence et progressivement à la mort cellulaire dû à l'activation des voies de TP53/RB1 causé par le dysfonctionnement télomérique. Dans l'oncogenèse, lorsque les transformations génomiques empêchent la mort cellulaire, l'accumulation de mutations, d'anomalies chromosomiques et d'instabilité chromosomique est enclenchée. L'hypothèse de la relation entre l'instabilité chromosomique, le nombre d'anomalies et l'agressivité du cancer a déjà été établie dans le GBM (Kramar et coll. 2007). L'altération de la longueur des télomères dans les cancers du cerveau a aussi été définie comme un mauvais pronostic (Hiraga et coll. 1998; Maes et coll. 2007; Ohali et coll. 2006).

Afin de conserver le potentiel prolifératif illimité des cellules, des mécanismes d'entretien des télomères sont recrutés (réactivation de la télomérase ou mécanisme alternatif d'élongation (ALT)). Un seul ou encore les deux mécanismes peut être retrouvé dans une même cellule (McDonald et coll. 2010). La télomérase est connue pour allonger les télomères de façon uniforme tandis que le mécanisme d'ALT allongerait les télomères de façon alternée pour créer une grande hétérogénéité au niveau de la longueur individuelle des télomères. La présence de l'ALT dans certains spécimens pourrait donc

expliquer l'hétérogénéité dans la longueur des télomères et les bandes diffuses en TRF. Tel qu'expliqué précédemment, la présence d'anomalie du gène ATRX pourrait être aussi retrouvée simultanément.

Étant donné la quantité de matériel limitée et le fait que les techniques de laboratoire permettant d'identifier les mécanismes d'entretien des télomères sont longues et fastidieuses (particulièrement l'ALT), l'identification des mécanismes impliqués n'a pas été effectuée dans le cadre de mon projet de recherche. Le mécanisme d'ALT a été montré comme étant favorable pour la survie des patients (Chen et coll. 2006; Hakin-Smith et coll. 2003) et l'identification de ces mécanismes dans nos spécimens serait une perspective de comparaison intéressante. Les caryotypes et la mesure individuelle des télomères permettent d'identifier différents clones cellulaires et de mieux discuter de l'hétérogénéité retrouvée dans la longueur des télomères (section 4.3).

4.2.2 Différentes « populations télomériques »

L'hypothèse initiale émise en observant plusieurs bandes dans un spécimen (figure 13) est la possibilité d'observer deux populations clonales distinctes aux longueurs télomériques différentes. Cette hypothèse ne peut pas être confirmée ni infirmée par les résultats de caryotypes ou de longueurs individuelles. La deuxième hypothèse proposée est la présence de télomères très courts et de longueur normale dans les mêmes cellules. En observant chaque cellule analysée de façon individuelle, cette deuxième hypothèse ne peut pas être confirmée non plus. Dans les deux cas, il est possible que la culture cellulaire implique une sélection clonale et qu'une seule de ces populations soit sélectionnée dans nos cellules métaphasiques et, donc, dans nos caryotypes et dans nos mesures de longueur individuelle.

Au niveau des profils télomériques, étonnamment, les deux spécimens (3 et 6) montrent un raccourcissement des télomères 13q. Le 13q, retrouvé normalement dans les télomères constitutivement longs se retrouve dans une position plus mitoyenne dans les profils de longueurs (annexe 4, E) et G)). Ces deux cas possèdent aussi tout les deux le 13p dans les plus longs. Ils montrent aussi une absence ou un raccourcissement du 2q, 3q, 6p et 11p. Il est possible que des évènements précurseurs similaires dans les deux cas aient mené à la formation de population ou de variation de la longueur des télomères

menant à l'observation du phénomène de « population télomérique ». Un résultat semblable a déjà été décrit dans l'analyse d'astrocytomes par Kheirollahi et coll. 2011, mais n'a pas été abordé dans leur discussion.

4.2.3 Comparaison de la longueur moyenne avec la survie des patients

En comparant la longueur moyenne des télomères avec la survie des patients, on remarque une tendance à ce que les spécimens avec une longueur moyenne courte aient aussi une survie de courte durée suite à l'opération (figure 30).

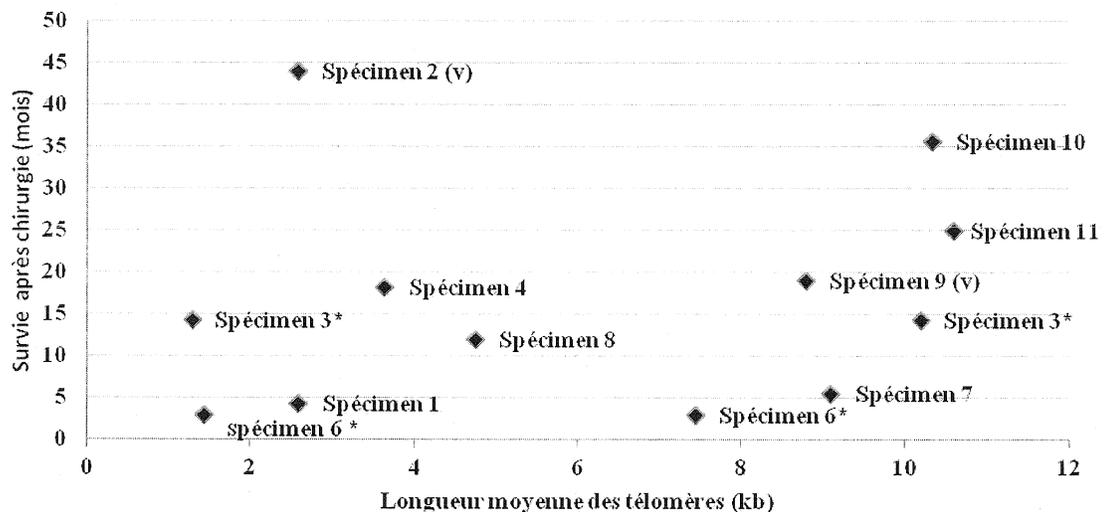


Figure 30. Longueur moyenne des télomères en fonction de la survie après chirurgie des spécimens cliniques analysés. Certains patients étaient toujours vivants au moment de la prise de données (v) et les 2 spécimens montrant 2 « populations télomériques » sont indiqués (*).

Premièrement, parmi les spécimens à survie courte (≤ 10 mois), nous observons les spécimens 1, 6 et 7. Le spécimen 1 possède des télomères courts et une survie courte. Le spécimen 6 possède deux « populations télomériques ». Ce spécimen possède donc une population à télomères courts et plusieurs anomalies de structure, expliquant une survie courte après opération. Un seul de ces spécimens possède une longueur moyenne normale associée à une survie courte (spécimen 7; 5,5 mois). Ce spécimen provient d'une tumeur très agressive ayant évolué rapidement. Il possède aussi la bande la moins diffuse sur le TRF, ayant le moins d'hétérogénéité au niveau de la longueur (figure 13). On

observe plusieurs anomalies de structure, illustrant une grande instabilité chromosomique. On peut aussi voir un déplacement important des télomères constitutivement longs et courts au niveau du patron de longueur individuel (Annexe 4). L'hypothèse de la réactivation de la télomérase pourrait expliquer la bande moins diffuse et une agressivité plus élevée de la tumeur (Maes et coll. 2007). Ces différents facteurs peuvent expliquer l'agressivité de la tumeur sans raccourcissement de la longueur moyenne des télomères.

Deuxièmement, parmi les spécimens à survie intermédiaire (10 à 20 mois), on retrouve les spécimens 3, 4, 8 et 9. Le spécimen 3 possède deux « populations télomériques », le 4 et le 8, des télomères raccourcis et le 9, une longueur normale. Dans les tous cas, plusieurs anomalies de structure sont détaillées.

Finalement, les autres spécimens ayant une survie supérieure à 20 mois sont les 2, 10 et 11. Deux de ces spécimens (10 et 11) présentaient des télomères de longueurs normales lors de la chirurgie. Pour ce qui est du spécimen 2, il possède la survie la plus longue mais des télomères raccourcis. Aucune anomalie chromosomique n'est retrouvée et 60% de ces caryotypes sont normaux (annexe 3). Les observations sur le spécimen 2 peuvent suggérer que la présence d'anomalies chromosomiques peut influencer davantage la survie à court terme que le début d'instabilité génomique instauré par le raccourcissement des télomères.

La longueur des télomères semble avoir un lien avec la survie des patients. Par contre, la quantité d'anomalies chromosomiques (instabilité génomique) semble avoir un impact non-négligeable sur cette survie. La possibilité d'étudier plusieurs spécimens provenant de chirurgies d'un même patient pourrait nous donner des indications intéressantes sur l'évolution du cancer et l'espérance de vie.

4.2.4 Des bandes de longueurs spécifiques

Dans les spécimens 10 et 11, des bandes distinctes différentes de l'empreinte principale sont retrouvées (figure 13). Ce phénomène a déjà été décrit pour des bandes représentant un télomère de longueur distincte, souvent plus long (Samassekou et coll. 2011). Ces 2 spécimens proviennent d'une femme et d'un homme dans la cinquantaine avec une survie supérieure à 25 mois.

Notre hypothèse principale est donc que ces deux bandes correspondent chacune à plusieurs télomères ayant des longueurs très similaires. L'hypothèse de la formation de deux « populations télomériques » n'est pas à écarter, car il est aussi possible que les deux bandes soient formées par le raccourcissement des télomères d'une population clonale. La bande spécifique dans le TRF du spécimen 11 ressemble davantage au phénomène identifié par Samassekou et coll. en 2011. L'hypothèse expliquant la présence d'un télomère particulièrement allongé est la présence du mécanisme alternatif d'allongement des télomères (ALT). Une des caractéristiques principales de ce mécanisme est l'hétérogénéité des longueurs des télomères et la présence de télomères anormalement longs (Bryan et coll. 1995; Hakin-Smith et coll. 2003; Samassekou et coll. 2011). L'hypothèse reliée au télomère allongé suggère que celui-ci est préférentiellement maintenu ou allongé dans les premiers stades de la transformation oncogénique (Samassekou et coll. 2011). Cette hypothèse coïncide aussi avec nos résultats obtenus par la comparaison avec les télomères constitutivement courts et longs en section 4.3.

La présence d'une bande spécifique peut aussi répondre à l'hypothèse de l'évènement clonal, c'est-à-dire la présence d'une population cellulaire différente ayant divergé dans son évolution et montrant des longueurs télomériques différentes. Dans ce cas-ci, la bande pourrait aussi illustrer la présence d'une population avec des télomères de longueurs homogènes. Les bandes spécifiques dans le TRF est un phénomène décrit seulement dans les cellules cancéreuses (Samassekou et coll, 2009).

4.3 Télomères les plus courts et les plus longs

Le profil des longueurs individuelles et l'identification des télomères constitutivement longs et courts ont été définis par l'équipe du Dr Yan (Samassekou et coll. 2011). Le profil a été identifié dans des lymphocytes normaux et comparé au profil de cellules leucémiques (LMC) (figure 6 et 8). La même technique et les mêmes appareils ayant été utilisés dans le cadre de mon projet, les résultats peuvent donc être comparés afin de vérifier si des évènements semblables peuvent être identifiés au niveau du cancer du sang et du cerveau. Toutefois, plusieurs biais sont introduits dans ces comparaisons. Premièrement, il s'agit de deux types cellulaires différents, le GBM étant un cancer solide et complètement différent de la leucémie. Les résultats obtenus pour les cellules

sanguines et les cellules leucémiques sont, malgré tout, les seules références disponibles dans le cadre de notre étude sur la longueur individuelle des télomères. Dans les cellules normales, les télomères 17p, 22q, 19p, 17q, 16p et 12p sont considérés constitutivement courts et les 4q, 13q, 5p, Xp et 3p constitutivement longs. Pour ce qui est des LMC, on ajoute les 21p, 22p, 20q, 2q et 21q comme constitutivement courts et les 14p, 18p, 7q et 11p comme longs (Samassekou et coll, 2010).

Les télomères constitutivement longs et courts observés par Samassekou et coll. ont été définis statistiquement par la différence significative au niveau du score Z (≥ 2), équivalent à deux écart-types supérieurs ou inférieurs à la moyenne dans une distribution normale des données. Les valeurs obtenues pour les longueurs des télomères des GBM ne nous ont pas donné de distribution normale et l'analyse par score Z n'était alors pas prescrite. Le seuil de significativité a été établi à 5%, donc aux télomères se trouvant dans les 2,5% supérieur et inférieur de la distribution. Les graphiques de comparaison avec les télomères constitutivement courts et longs identifiés par Samassekou et coll se retrouvent en annexe 4.

La comparaison avec les longueurs télomériques retrouvées dans les LMC a été faite afin d'avoir une source de comparaison supplémentaire pour nos données de GBM, étant donné qu'aucun contrôle négatif n'est accessible pour ce type cellulaire. Les LMC sont reconnues pour être beaucoup moins hétérogènes que les GBM au niveau du caryotype. La LMC est une maladie myéloproliférative caractérisée par la translocation $t(9,22)(q34;q11.2)$ aussi appelé le chromosome de Philadelphie. Cette translocation implique la formation d'un gène de fusion (BCR-ABL) et l'augmentation de l'activité tyrosine kinase reliée à la protéine de fusion. Les GBM présentent des anomalies chromosomiques nombreuses et variables. L'augmentation de l'activité tyrosine kinase telle que décrite dans les LMC peut aussi être présente dans les GBM et être traitée par l'Imatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase fréquemment utilisé dans le traitement des LMC (Bilir et coll. 2008; Kast and Focosi 2010; Kilic et coll. 2000). Malgré leurs nombreuses différences, ces deux cancers peuvent présenter des similarités et la comparaison entre les résultats obtenus pour les deux cancers avec les mêmes techniques pourrait tout de même nous indiquer des événements retrouvés dans l'évolution tumorale.

- Les gènes CDKN2A, CDKN2B, PTPRD se retrouvent sur ce bras chromosomique et sont reconnus comme étant délétés dans les GBM. Le raccourcissement du 9p pourrait être un marqueur d'agressivité tel qu'observé dans le spécimen 2.
- Le **12p** est court dans les spécimens 3 et 11. Il est aussi retrouvé long dans deux spécimens dits « agressifs » avec survie courte: U-87 et 1 (4,3 mois). Il est donc possible de suggérer la surveillance de la longueur de ce télomère dans l'évolution de l'agressivité du cancer. Le gène CCND2, souvent amplifié, se retrouve sur ce bras.
- Le **12q** est court dans le spécimen 9 (14,3 mois) et long dans les spécimens 8 et 11 (moins de 12 et 25 mois).
- Le **2q** est court dans le spécimen 3 (14,3 mois) et long dans le spécimen 5 (non-disponible). Le 2q court a aussi été observé dans les LMC. Le gène LRP1B est reconnu comme étant délété sur le 2q dans 7% des GBM.
- On identifie le **Yp** court dans les tumeurs les plus agressives (U-87 et 7) tandis qu'il est retrouvé long dans les spécimens 2 et 11, deux cas ayant la survie la plus longue. L'équipe de Samassekou et coll. a décrit que le Yp était retrouvé parmi les plus longs télomères autant dans les cellules normales que dans les LMC. Par contre, il est important de mentionner que le nombre de données relatives au chromosome Y peut être un biais à l'étude étant donné que ce chromosome est perdu dans plusieurs cellules, tel que mentionné par Samassekou et coll, ayant retiré des analyses les données relatives au Y dans leur étude parue en 2011.
- Le télomère **20q** est long dans le spécimen 7 (5,5 mois) et court dans les LMC. Ce télomère est à surveiller comme marqueur d'agressivité exclusif au GBM.
- Finalement, on observe le **16p** étant constitutivement court et anormalement retrouvé dans les plus longs dans l'échantillon U-87 MG et qui n'a pas été observé dans les LMC.

Il serait nécessaire d'analyser plusieurs autres spécimens cliniques de GBM afin de confirmer ou infirmer ces hypothèses. Au regard des résultats obtenus, il est aussi possible de se demander si une grande différence de longueur entre le p et le q augmente

l'instabilité chromosomique et le risque de translocation. Ces observations peuvent servir de nouvelles pistes dans l'étude des télomères dans les GBM.

4.3.1 Analyse des profils des télomères

Dans les U87-MG et les spécimens 1, 7 et 8 (ayant la survie la plus courte), on remarque un déplacement important dans le profil des télomères constitutivement longs et courts. On remarque un « raccourcissement » des télomères longs et un « élévation » des télomères courts. Bien entendu, la longueur de ces télomères est raccourcie de façon globale.

On remarque que le 17p ne fait pas partie des télomères les plus courts de tous les spécimens, en comparaison avec le profil attendu dans des cellules normales (figure 6; annexe 4). En observant les profils, il est possible d'identifier globalement quels télomères ont des positions qui varient (plus courts ou plus long comparativement aux autres) dans les profils de spécimens tumoraux. Au niveau des GBM analysés, dans le profil global, le **12p** est maintenu plus long dans plus de 50% des spécimens. On peut faire les mêmes observations avec le **16p** dans près de 60%, le **22q** dans plus de 40% le **17q** dans 25%, le **19p** dans plus de 15% et le **17p** dans 33% des spécimens étudiés. On remarque que certains gènes sont aussi associés à ces bras chromosomiques et peuvent être amplifiés ou perdus: CCND2 (12p), TP53 (17p), RB1 (17q), TIMP3 (22q).

Ces observations permettent de suggérer la même hypothèse que retrouvée dans les LMC, c'est-à-dire que la longueur de certains télomères peut être préférentiellement maintenue dans l'évolution du cancer.

4.4 Anomalies chromosomiques

Les anomalies chromosomiques se divisent en anomalies de structure et en anomalies de nombre. Les anomalies de structures retrouvées sont majoritairement des dérivés provenant de divisions cellulaires ayant subi des événements de recombinaisons. Les anomalies de nombres impliquent des aneuploïdies (chromosomes délétés ou surnuméraires), ou encore de la polyploïdie (triploïdie, tétraploïdie).

Il a déjà été établi que le raccourcissement des télomères implique une instauration de l'instabilité chromosomique dans la cellule et favorise les fusions des extrémités chromosomiques (*end-to-end fusion*) et, ainsi, favorise l'échange de matériel génétique d'un chromosome à l'autre (section 1.3.4) (Londono-Vallejo 2008). L'hypothèse de départ était de retrouver un plus grand nombre d'anomalies chromosomiques dans les spécimens ayant une longueur moyenne télomérique faible et que ceux-ci seraient reliés à une survie courte.

Les profils de longueurs individuelles seront comparés avec les anomalies chromosomiques retrouvées dans chacun des spécimens. La revue de littérature sur les anomalies retrouvées dans les GBM indique que les délétions du 5p, 22p, Xp, des segments des chromosomes du 3 et du 13 semblent être retrouvées fréquemment, en plus des duplications des chromosomes 1 et 7 et des parties du 2, 12 et 20 (section 1.4.1).

4.4.1 Sommaire

Dans notre analyse, seules les extrémités chromosomiques pouvant être clairement identifiées dans les anomalies ont été intégrées dans les données de longueurs individuelles. Plusieurs données de longueurs télomériques provenant des anomalies n'ont donc pu être intégrées dans les longueurs individuelles. Ces données ont tout de même été incluses dans la moyenne d'intensité de signal de Q-FISH pour la conversion avec la moyenne de TRF en kb.

Les délétions identifiées dans nos cellules ont été notées indépendamment des anomalies chromosomiques. Certaines parties des chromosomes absentes sont retrouvées dans les chromosomes réarrangés. La résolution des métaphases ainsi que le marquage en bande DAPI n'étant pas toujours de bonne qualité, il n'a pas été possible d'identifier de façon précise les délétions et amplifications causées par les réarrangements. L'utilisation de la technique d'hybridation génomique comparative (CGH) sur micropuce ou des micropuces à SNP nous permettrait d'évaluer les aberrations du nombre de copies de gènes tels que les gènes amplifiés et délétés mais aussi d'identifier les points de cassures de nos chromosomes. De plus, les micropuces à SNP nous permettraient de détecter les LOH sans modifications du nombre de copies ou les disomies uniparentales.

Plusieurs spécimens caractérisés comme étant indolents présentent une grande hétérogénéité au niveau des anomalies de structure retrouvées tandis que les anomalies dans les spécimens agressifs sont plus souvent récurrentes dans les cellules. Cette observation est facilement explicable par le phénomène de sélection clonale, qui conservera les cellules cancéreuses avec des anomalies de structure plus favorables au développement tumoral (Kros et coll. 2001). Cette sélection clonale peut aussi représenter un biais dans l'étude, étant donné que l'échantillon tumoral provient d'une petite partie de la tumeur qui, elle-même, est hétérogène.

Dans plusieurs spécimens, on observe des amplifications des chromosomes 1 et 7, des anomalies déjà bien documentées dans la littérature (Arslantas et coll. 2007; Marumoto and Saya 2012; Nicholas et coll. 2011). Ces modifications au niveau chromosomique ont des impacts importants et il a été grandement discuté des effets moléculaires de ces changements dans l'initiation, la progression et l'agressivité des tumeurs astrocytaires (Arslantas et coll. 2007).

4.5 Conclusion

Il s'agit du premier projet d'étude sur la longueur individuelle des télomères dans les GBM. Les résultats obtenus nous permettent de faire plusieurs hypothèses mais le nombre de spécimens analysés demeure faible et ne permet pas d'émettre de conclusion. Cette partie de l'étude a été réalisée dans le but d'identifier les profils de longueurs de télomères et de pouvoir soulever des hypothèses quant aux événements liés à la cancérogenèse et aux changements dans la longueur individuelle des télomères.

Plusieurs observations ont été faites et il a été possible de faire plusieurs liens entre les variables étudiées. On note que, de façon globale, dans nos spécimens, les valeurs obtenues coïncident avec les attentes :

- Les tumeurs décrites comme étant agressives ont une survie courte après diagnostic et présentent des télomères courts et/ou plusieurs anomalies chromosomiques.
- Les tumeurs décrites comme étant indolentes ont une survie plus longue après le diagnostic et présentent des télomères souvent de longueur normale et un nombre inférieur d'anomalies chromosomiques comparativement aux tumeurs agressives.

Au niveau des profils de longueurs individuelles, plusieurs observations ont été faites :

- Les télomères constitutivement longs et conservés dans les plus longs sont retrouvés dans des cas avec survie longue.
- Le raccourcissement du 21p a été identifié dans les LMC et aussi dans les GBM. Cet évènement pourrait être considéré comme un évènement important dans la cancérogenèse.
- Le raccourcissement des télomères des bras chromosomiques 9q, 3q et du 2q a été identifié dans plus d'un spécimen des GBM.
- Le raccourcissement du 22p de même que l'élongation des télomères des bras chromosomiques 16p et 10q peuvent être des évènements exclusifs au processus de cancérogenèse du GBM.
- Les télomères 9p et 12p courts peuvent être des candidats intéressants pour des marqueurs d'agressivité et de survie à court terme des GBM.
- Les variations de longueurs du 22p et du 12q semblent exclusives aux GBM.
- Les télomères 20q et 16p long sont à surveiller comme marqueur d'agressivité exclusif au GBM.
- Globalement, selon les profils de longueurs individuelles, les télomères 12p, 16p, 17p, 17q, 19p et 22q sont maintenus ou allongés pendant le processus d'oncogenèse.

Du côté des anomalies chromosomiques, on note les délétions des chromosomes 1, 2, et 20 ainsi que des parties de 6, 11q, 13, 14 et 18. En ce qui concerne les duplications, on retrouve majoritairement des duplications du bras court du chromosome 4 et une partie du 7 surnuméraires. La plupart de ces observations ont déjà été rapportées dans la littérature (Arslantas et coll. 2007; Bleeker et coll. 2012; Dahlback et coll. 2009; Kleihues and Ohgaki 1999; Ohgaki and Kleihues 2013).

Finalement, l'hétérogénéité cellulaire retrouvée dans les GBM implique de grandes variations au niveau des gènes modifiés, des anomalies de nombre et de structure, et ce, dans une même tumeur. L'hétérogénéité retrouvée dans la longueur initiale des télomères à la naissance ainsi que le raccourcissement des télomères due à l'âge sont des variables

donc l'impact est présentement inconnu sur la longueur individuelle des télomères. La présente étude axée sur la longueur individuelle des télomères ajoute une nouvelle perspective sur le rôle que la structure des chromosomes peut jouer dans les différents stades d'évolution du cancer. Les avancées technologiques dans les techniques et outils permettant les mesures des télomères dans les cellules permettront de simplifier les analyses et manipulations présentement longues et fastidieuses sur les cellules de GBM. L'utilisation de nouvelles technologies et la compréhension des mécanismes tumoraux complexes des GBM favorisera, dans un avenir rapproché, l'utilisation du profilage des anomalies génétiques et structurelles dans l'évaluation du pronostic et du traitement du cancer. La compréhension de l'évolution du cancer en fonction des changements dans le profil des longueurs des télomères permettrait l'utilisation d'un nouvel outil pronostic d'intérêt.

4.6 Perspectives

Notre projet n'étant que préliminaire, plusieurs perspectives sont applicables à la continuité des travaux. L'augmentation du nombre de cas cliniques analysés sera une priorité pour la continuité du projet de caractérisation de la longueur individuelle des télomères dans les GBM. La comparaison des échantillons de GBM avec des échantillons sanguins provenant des patients pourrait apporter une comparaison des plus intéressantes pour ce qui est du profil de longueurs individuelles.

Au niveau des manipulations, plusieurs pourront être ajoutées au projet tels que l'identification des mécanismes d'entretien des télomères (détection des corps leucémique promyélocytaire associés à l'allongement alternatif des télomères (APB), activité de la télomérase), la mesure des longueurs absolues des télomères par PCR quantitatif en temps réel, la recherche d'anomalies subtélomériques, l'identification des anomalies des gènes d'importances dans le GBM primaire et secondaire (IDH1/2, ATRX, TERT, EGFR, CIC, etc.), le séquençage de « nouvelle génération » pour l'étude en profondeur des télomères. L'analyse d'autres lignées cellulaires de GBM permettrait aussi d'ajouter des contrôles positifs au projet. L'ajout de variables supplémentaires concernant le degré de résection, le volume, la provenance du spécimen dans la tumeur et

une description complète de l'évolution du cancer permettraient d'être pris dans le cadre d'une étude multivariée plus complète.

Bien que subjectives sur l'état de désordre de la cellule, les anomalies chromosomiques répertoriées par caryotypage sont aussi accompagnées de changements épigénétiques (i.e. méthylation de l'ADN) et de structures secondaires influençant l'architecture tridimensionnelle de la cellule. La vérification de certains gènes connus ayant des changements au niveau du statut de méthylation ainsi que l'analyse de l'architecture nucléaire des télomères par Q-FISH tridimensionnelle serait des perspectives tout aussi intéressantes. Il serait alors possible d'aller corrélérer nos résultats avec les groupes de survie de patients établis par Gadji et coll. en 2010.

Les recherches sur le GBM ont permis de connaître davantage les caractéristiques et le comportement de ce cancer, mais il y a encore beaucoup à apprendre. Notre travail semble avoir ouvert le chemin sur plusieurs hypothèses concernant la régulation de la longueur des télomères dans les GBM et la continuité du projet de recherche permettra d'émettre davantage de conclusions.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mes co-directeurs de recherche, Dr David Fortin et Dr Régen Drouin, de m'avoir offert l'opportunité de continuer mes études de deuxième cycle dans leurs équipes. Il faut souligner le travail exemplaire de la professionnelle de recherche, Dr Josée Lamoureux, m'ayant encadré, appuyé et encouragé tout au long de mes études supérieures. J'aimerais aussi remercier Dr Marie-Belle Poirier et Éric Bouchard, pour leur supervision et leur collaboration à mon travail.

J'aimerais particulièrement remercier l'équipe transdisciplinaire en génétique dirigée par les Dr Régen Drouin et Dr Chantal Bouffard de m'avoir constamment encouragé à augmenter et à partager mes connaissances. Mes collègues au cours de ces 2 années ont été sources d'inspiration et de persévérance.

Finalement, l'appui et l'encouragement de ma famille et de mes amis reçus tout au long de mes études au baccalauréat et à la maîtrise ont été des éléments essentiels à ma réussite.

ANNEXES

6.1 Annexe 1. Caractéristiques cliniques des cas analysés.

#	Sexe	Âge au diagnostic (ans)	Diagnostic	Survie après le diagnostic/ chirurgie (mois)	Indice de prolifération Ki-67	Traitements Chimio/ radio	Agressivité de la tumeur	Nombre d'opérations (n)
1	F	54	GBM	4,3	ND	Aucun	+++	1
2	Y	41	GBM	44(v)	ND	1	indolent	1
3	F	39	*	14,3	ND	Aucun	indolent	1
4	F	59	GBM	18,2	25	2	ND	1
5	Y	43	GBM	ND	80	ND	ND	ND
6	F	62	GBM	>36/3	30	2	indolent	3
7	Y	25	GBM	5,5	ND	Aucun	+++++	1
8	Y	49	GBM	<12	ND	ND	+++	2
9	Y	72	GBM	19 (v)	80	1	ND	1
10	F	58	GBM	35,6	15	2	indolent	3
11	Y	54	GBM	25	-	2	ND	1

*Astrocytome avec légers changements anaplasiques

(v)= en vie, janvier 2013

ND= Information non disponible

6.2 Annexe 2. Données brutes des longueurs individuelles des télomères 1p à 12q

Spécimen	Bras chromosomiques																							
	1p	1q	2p	2q	3p	3q	4p	4q	5p	5q	6p	6q	7p	7q	8p	8q	9p	9q	10p	10q	11p	11q	12p	12q
U-87 MG	0,1	0,3	1,0	0,8	0,9	0,6	1,0	1,1	0,8	1,4	0,5	0,9	0,9	1,0	0,7	0,9	1,3	0,6	0,7	0,8	1,1	0,9	1,6	0,7
1	3,6	3,1	3,3	2,9	2,4	2,9	2,7	2,5	2,7	3,1	3,5	2,8	2,3	3,3	1,9	2,1	0,5	2,8	2,2	2,9	1,9	2,0	4,9	3,0
2	2,9	3,0	4,0	2,6	3,3	2,3	2,7	2,8	4,2	2,4	2,4	2,7	2,5	3,0	3,0	2,3	2,4	1,2	2,4	3,0	2,4	2,1	2,3	2,7
3	8,2	4,6	7,8	2,9	8,3	3,5	6,6	10,5	7,7	4,2	3,9	10,9	5,0	9,1	6,5	8,5	4,4	5,9	8,3	6,0	4,1	6,0	3,5	10,3
4	4,7	4,8	4,6	3,8	4,9	3,8	4,2	3,0	3,4	4,1	4,6	3,1	4,7	4,2	3,6	2,3	7,4	2,0	2,8	4,7	3,3	2,9	4,5	3,6
5	7,0	6,5	6,3	9,6	8,3	7,5	6,2	9,5	9,0	5,8	6,9	6,7	8,1	5,7	7,7	7,0	7,1	6,2	5,2	7,3	8,5	5,5	4,8	7,6
6	2,0	1,9	-	-	-	-	1,2	2,3	2,2	1,6	-	-	1,4	1,9	2,1	1,0	1,7	1,8	-	-	-	0,4	1,0	1,6
7	10,4	8,9	10,1	8,6	11,5	9,2	10,1	11,1	7,9	6,8	12,7	12,3	6,6	9,0	7,4	7,2	13,8	3,4	8,9	8,0	8,7	10,2	11,2	7,2
8	6,6	4,7	7,2	4,0	5,3	5,9	3,3	4,5	4,1	5,6	4,7	6,6	5,2	5,1	3,1	4,7	4,9	6,0	5,4	4,9	3,9	4,5	3,4	6,8
9	6,6	7,1	7,5	5,0	9,1	4,3	8,3	7,6	19,4	13,9	5,0	8,0	8,9	10,9	6,9	9,2	6,4	11,3	6,4	9,1	9,9	14,1	8,7	4,1
10	14,9	14,3	11,2	7,7	11,8	11,3	8,2	17,1	10,5	6,5	6,8	15,1	11,6	8,2	9,2	8,7	6,4	13,0	11,2	5,9	12,9	8,8	9,4	10,5
11	15,3	11,1	14,7	9,7	13,9	11,2	10,5	10,5	15,6	10,6	11,8	12,3	9,7	9,2	16,4	14,6	7,6	8,4	9,4	11,3	8,5	11,0	6,6	19,6

Annexe 2 (suite). Données brutes des longueurs individuelles des télomères 13p à Yq

Spécimen	Bras chromosomiques																							
	13p	13q	14p	14q	15p	15q	16p	16q	17p	17q	18p	18q	19p	19q	20p	20q	21p	21q	22p	22q	Xp	Xq	Yp	Yq
U-87 MG	0,4	1,2	0,6	0,7	0,5	1,1	1,5	1,1	1,1	1,1	0,9	0,8	0,9	0,8	1,0	1,5	0,6	0,9	0,5	0,9	0,7	0,6	0,2	-
1	1,1	2,6	1,9	1,9	2,0	3,3	2,4	2,4	2,0	2,6	2,6	2,3	1,9	1,8	2,6	2,3	2,3	1,8	1,3	2,4	2,7	3,0	n/a	n/a
2	3,1	3,0	2,5	3,2	3,3	1,9	2,2	3,4	1,7	1,7	2,7	2,0	1,3	1,8	1,8	1,5	2,9	2,1	2,6	2,9	1,6	1,5	4,8	1,9
3	11,8	7,1	7,4	8,7	6,9	5,2	8,0	6,7	5,4	4,1	5,5	9,0	5,4	4,2	6,1	5,0	7,2	4,3	7,9	4,7	8,5	6,0	n/a	n/a
4	2,6	2,5	3,4	3,9	3,1	2,9	3,2	4,0	2,1	2,2	3,0	3,2	2,5	3,4	2,7	3,2	3,5	2,5	2,0	2,1	4,4	5,2	n/a	n/a
5	7,9	7,2	5,9	7,0	4,9	6,1	6,1	5,9	4,7	6,0	5,9	7,5	4,4	4,6	5,7	4,8	5,6	4,6	6,7	3,6	5,9	5,4	8,6	3,4
6	3,2	1,6	1,4	1,9	1,1	1,3	1,3	1,1	1,4	1,1	1,5	1,3	1,0	1,1	1,1	1,6	1,9	1,3	4,2	1,8	2,1	2,0	n/a	n/a
7	11,9	5,7	7,7	6,4	9,0	9,9	7,1	8,6	8,9	5,3	7,6	8,0	8,7	8,9	9,8	15,1	15,5	9,6	10,6	10,1	8,8	10,6	4,5	6,3
8	3,4	4,0	4,4	5,3	3,3	3,3	4,0	3,5	4,0	4,3	5,3	3,5	4,6	3,8	4,6	5,8	2,1	4,3	3,1	3,1	3,4	4,9	3,6	4,4
9	11,6	14,2	12,2	9,6	8,7	7,9	8,2	7,5	8,0	6,5	8,8	6,6	6,1	8,0	10,6	7,7	9,4	6,0	14,0	4,3	17,1	6,1	13,7	12,1
10	10,7	15,7	8,1	9,3	13,9	7,3	12,4	4,7	9,3	8,7	8,1	10,2	7,3	7,8	13,8	8,4	11,6	7,2	4,2	11,8	17,3	5,6	n/a	n/a
11	13,4	9,1	10,7	9,0	12,7	9,6	10,3	8,3	9,4	7,3	9,0	7,8	9,4	8,2	7,7	7,4	6,9	8,5	8,1	8,2	11,9	11,2	19,0	11,5

6.3 Annexe 3. Anomalies chromosomiques dans les différents spécimens de GBM.

U-87 MG

#cellule	# chromosome	Chromosomes surnuméraires	Délétions	Dérivés
1	45,XXY	X	1, 1, 11q, 12, 13, 14, 14, 16, 20, 22	der(1)(1qter→1p?::13q?→13qter), der(1;22)(?10;?10), der(4;12)(?10;?10), der(10;16)(?10;?10), der(14;22)(?10;?10), der(22)(10qter→10q?::22p?→22qter) ins(14,1)(?;?)
2	45,X	4q	1, 2, 9q, 10q, 11, 12, 13, 14, 16, 18q, 10p, 22	der(4;22)(q10;q10), der(9;14)(q10;?10)
3	44,XX	X	1, 1, 9, 10q, 11, 12, 13, 14, 16, 20p	der(1)(13qter→13q?::1p?→1qter), der(4;22)(q10;q10), der(7)(7pter→q?::6q?→6qter), der(9;13)(?10;?10), der(12)t(6;12)(?;q?), der(16)(1pter→1p?::16p?→16qter), der(20)(20pter→20q?::1p?→1p?::14q?→14qter)
4	44,X	4p	1, 1, 6, 10q, 11, 12, 13, 14, 16, 21, 22	der(6;9)(?10;?10), der(9,19)(?10;?10), der(6;22)(?10;?10), der(7;13)(?10;?10), der(7)(7pter→q?::6q?→6qter), der(7;19)(?10;?10), der(21;22)(?10;?10), der(16)(1pter→1p?::16p?→16qter), der(20)(20pter→20q?::1p?→1p?::14q?→14qter)
5	41,X		1, 1, 6, 6, 8, 10q, 11, 12, 13, 14, 16, 22	der(1)(13qter→13q?::1p?→1qter), der(1,13)(q10;?10), der(6;18)(?10;?10), der(7)(7pter→q?::6q?→6qter), der(16)(1pter→1p?::16p?→16qter), der(20)(20pter→20q?::1p?→1p?::14q?→14qter), der(22)(10qter→10q?::22p?→22qter)
6	43,X		1, 1, 5, 6, 6, 10q, 13, 14, 16, 17, 22	der(1;9)(?10;?10), der(1)(13qter→13q?::1p?→1qter), der(7)(7pter→q?::6q?→6qter), der(1;13)(q10;?10), der(4;17)(?10;?10), der(7;16)(?10;q10), der(20)(20pter→20q?::1p?→1p?::14q?→14qter), der(22)(10qter→10q?::22p?→22qter)
7	44,X		1, 1, 6, 9, 10q, 11q, 13, 14, 16, 18q, 22	der(1)(13qter→13q?::1p?→1qter), der(7)(7pter→q?::6q?→6qter), der(7;13)(?10;?10), der(12)t(6;12)(?;q?), der(16)(1pter→1p?::16p?→16qter), der(20)(20pter→20q?::1p?→1p?::14q?→14qter), der(22)(10qter→10q?::22p?→22qter)
8	83,XX		4x1, 3, 3x6, 2x10q, 2x11q, 2x13, 2x14, 16, 17, 18, 2x19, 2x20, 2x22	der(1;9)(?10;?10), der(1)(13qter→13q?::1p?→1qter)x2, der(3;22)(?10;?10), der(6;12)(p10;?10), der(7)(7pter→q?::6q?→6qter), der(10;22)(q?10;?10), der(12;17)(?10;?10), der(10;16)(?10;?10), der(20)(20pter→20q?::1p?→1p?::14q?→14qter)
9	47,XY	20	1, 1, 5q, 6, 6, 8, 9, 10q, 11q, 12, 13, 14, 14, 15p, 16, 16, 18	der(1;7)(?10;?10), der(1)(13qter→13q?::1p?→1qter), der(6;12)(p10;?10), der(7)(7pter→q?::6q?→6qter), der(7;13)(?10;?10), der(8;14)(?10;q10), der(8;15)(?10;?10), der(10;22)(?10;?10), der(15;16)(?10;?10), der(16)(1pter→1p?::16p?→16qter), der(16;18)(?10;?10), der(20)(20pter→20q?::1p?→1p?::14q?→14qter)

10	42,X		1, 1, 2, 6, 6, 7, 10q, 11q, 13, 14, 16, 18, 21, 22	der(1)(13qter→13q?:1p?→1qter), der(6;18)(?10;?10), der(2;3)(?10;?10), der(7)(7pter→7q?:6q?→6qter), der(10; 21)(?10;?10), der(10;22)(?10;?10), der(16)(1pter→1p?:16p?→16qter), der(20)(20pter→20q?:1p?→1p?:14q?→14qter)
11	45,XY	X	1, 1, 3, 6, 9, 10, 11q, 13, 14, 16, 20p, 22	der(1) (13qter→13q?:1p?→1qter), der(1;14)t(14;1;13)(?10;?10;?), der(3;22)(?10;?10), der(6;12)(p10;?10), der(7)(7pter→q?:6q?→6qter), der(7;10)(?10;?10), der(9;13?)(?10;?10), der(10;22)(?10;?10), der(16)(1pter→1p?:16p?→16qter), der(20)(20pter→20q?:1p?→1p?:14q?→14qter)

Spécimen 1

#cellule	# chromosome	Chromosomes surnuméraires	Délétions	Dérivés
1	75,XXX	X,X, 1, 2, 3p, 5, 7, 7, 7, 8, 15, 17, 20, 20	8, 9, 9, 9, 10, 11, 11, 11, 12, 12, 13, 14, 14, 14, 18, 19, 21	der(1)t(1;6) (?:?) x2
2	77, XXX	X, 2q, 3, 4, 5, 5, 7, 7, 8, 12p, 15, 17, 20, 20	9, 9, 9, 12, 13, 13, 14, 16, 18, 19, 21	t(7;19)(?:?), der(7)t(7;9)(?:?) der(9)t(9;12)(?:?)t(9;18)(?:?), der(9)t(9;18)(?:?), der(13;16)(?:?), + mar
3	74,XXX	X, 1, 2p, 5, X, 6, 7, 7, 7, 8, 15, 17, 20, 20	4, 9, 9, 9, 12, 13, 14, 18, 19, 21,	der(1)t(1;6) (?:?), der(9)t(9;18)(?:?), der(20)t(2;20)(?:?)
4	74,XXX	X, 6, 7, 8, 10, 15, 17, 20,	9, 9, 9, 13, 14, 18, 19,	der(1)t(1;5)(p?:q?), der(9)t(9;18)(?:?)x2
5	69,XXX	X,2p, 3, 5, 15, 17, 20	1, 4, 8, 9, 9, 9, 10, 13, 14, 16, 18, 19, 21	der(1;14)(q10;?10), der(7;8)(?10;?10) der(7)t(7;9)(?:?), t(7;19)(?10;?10), der(9)t(9;18)(?:?)x2, der(1)t(1;13)(p?:?)
6	76,XXX	X, 1, 1, 2q, 3, 5, 7, 7, 7, 8, 15, 17, 20, 20	9, 9, 9, 13, 14, 18, 19, 21	der(9)t(9;18)(?:?)x2
7	38,X	7, 7, 7, 16, 20, 22	1, 1, 2, 4, 4, 5, X, 8, 9, 9p?, 10, 14, 14, 18, 19, 21, 21	der(9)t(9;18)(?:?)
8	77,XXX	X, 1, 3, 5, 7, 7, 7, 8, 15, 17, 20, 20	4, 9, 9, 13, 14p, 14q, 19, 21	der(1)t(1;6) (?:?), der(10)t(2;10)(?:?)
9	76,XXX	X, 12, 3, 5, 7, 7, 7, 8, 15, 17, 20, 20	9, 9, 9, 13, 14, 18, 19, 21	der(1)t(1;6) (?:?)
10	65,XXX	X, 1, 2p, 20	4, 8, 9, 9, 9, 10, 13, 14, 16, 18, 18, 19, 21, 21	der(7)t(7;8)(?:?), der(9)t(9;18)(p?:q?), der(15)t(3;15)(p?:?), der(17;18)(?:?) der(18)t(9;18)(p?:p?), +mar
11	46,X	2p, 2q, 6, 7, 8, 10, 11, 15, 20, 22	1, 4, X, 9, 9, 13, 14, 14, 17, 18, 21	der(X;21)(?10;?10)

Spécimen 2

#cellule	# chromosome	Chromosomes surnuméraires	Délétions	Dérivés
1	45,XY		3	
2	87,XXYY		1, 1, 3, 13, 13	
3	46,XY			
4	33,X		1, 5, 5, 6, 10, 14, 15, 16, 19, 21, 21, 22	
5	46,XY			
6	46,XY			
7	46,XY			
8	46,XY			
9	45,XY		21	
10	46,XY			

Spécimen 3

# cellule	# chromosome	Chromosomes surnuméraires	Délétions	Dérivés
1	46,XX			
2	46,XX			
3	46,XX			
4	46,XX			
5	46,XX			
6	46,XX			
7	46,XX			
8	46,XX			
9	46,XX			
10	46,XX			
11	46,XX			
12	46,XX			

13	46,XX
14	46,XX

Spécimen 4

#cellule	# chromosome	Chromosomes surnuméraires	Délétions	Dérivés
1	70,XXX	2, 3, 6, 7, 15, 16, 20	9, 10, 11, 19, 22	der(2;4)(?10;?10), der(7;17)(?10;?10), der(9;22)(q10;q10), +mar
2	67,XXX	1, 3, 6, 20, 21	2, 2, 4, 9, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 22	der(7;17)(?10;?10), der(9;22)(q10;q10),
3	71,XXX	13, 5, 6, 8, 16, 20	9, 10, 11, 13, 14, 17, 21, 22	der(7;17)(?10;?10), der(9;22)(q10;q10), der(20;22)(?10;?10)
4	73,XXX	X, 1, 3, 5, 7, 8, 15, 15, 18, 20, 21	9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 22	der(7;17)(?10;?10), der(9;22)(q10;q10),
5	72,XXX	13, 5, 6, 8, 15, 20, 21	9, 10, 11, 13, 14, 17, 22	der(7;17)(?10;?10), der(9;22)(q10;q10)x3
6	71,XXX	15, 6, 8, 15, 20, 21	9, 10, 11, 13, 14, 17, 22, 22	der(7;17)(?10;?10), der(9;22)(q10;q10)
7	74,XXX	1, 5, 6, 8, 16, 20	9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 22	der(7;17)(?10;?10), der(9;22)(q10;q10)x2, der(18)t(18;21)(?10;?10)
8	79,XXX	X, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 15, 16, 19, 20, 21	9, 10, 13, 14, 22	der(9;22)(q10;q10) x2
9	71,XXX	16, 8, 20, 21	9, 10, 11, 13, 14, 17, 22	der(7;17)(?10;?10), der(9;22)(q10;q10)x2, der(11;15)(?10;?10)
10	61,XXX	1, 2, 5, 19	3, 8, 8, 9, 9, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 21, 22	der(9;22)(q10;q10)x2

Spécimen 5

#cellule	# chromosome	Chromosomes surnuméraires	Délétions	Dérivés
1	46,XY			
2	45,X		Y	
3	72,XXYY		1, 2, 4 x2, 5 x2, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22	der(14;22)(?10;?10)
4	46,XY	X	5	

5	46,XY	6
6	43,XY	7, 8, 8
7	46,XY	
8	46,XY	
9	46,XY	
10	45,X	Y

Spécimen 6

#cellule	# chromosome	Chromosomes surnuméraires	Délétions	Dérivés
1	47,XX	X, 7	1, 2, 2, 3, 3, 5, 6, 1, 8, 9, 10, 10, 11, 11, 12, 15, 16, 19	der(1;5)(?10;q10), del(2)(q?), der(2)(6?→6?::2?→2?::3?→3q), der(2)t(2;19)(?;?), der(5;1)(5p→5?::10?→10?→1?::2?→2?), der(3)t(3;9)(?;?), ins(3;9)(3pter→3q?::9?→9?::3q?→3qter) der(6)(6p→6q?::2?→2?::1?→1?), t(8;11)(p10;p10), der(10)t(3;10)(?;?), der(11)t(11;12)(?;?), der(12;22)(?10;?10),), t(15;16)(p10;?10), der(19)t(10;19)(?;p?), der(19;20)(?10;?10
2	47,XX	X	1, 2, 2, 3, 3, 5, 6, 6, 8, 9, 10, 10, 11, 11, 12, 16, 19, 20	der(1;5)(?10;q10), der(1;14)(14?→14?::1?→1?::7?→7?), der(2;19)(?10;?10)x2, der(3)t(3;9)(?;?), der(3;16)(?10;?10), der(6)(6p→6q?::2?→2?::1?→1?), der(7;14)(?10;?10), der(7;19)(?10;?10) x2, der(9;19)(?10;?10), der(11)t(11;12)(?;?), t(15;16)(p10;?10), der(15;16)(q10;?10)
3	47,XX	X, 7, demi7	1, 2, 2, 3, 3, 5, 6, 6, 8, 9, 10, 10, 11, 12, 15, 16, 19	der(1;5)(?10;q10), der(2)(1?→1?::2?→2?::6?→6?) der(2;19)(?10;?10), der(3)t(3;9)(?;?), ins(3;9)(3pter→3q?::9? →9?::3q?→3qter), der(5;1)(5p→5?::1?→1?::2?→2?), der(6)(6p→6q?::2?→2?::3?→3?), t(8;11)(p10;p10), der(9;19)(?10;?10), der(10)t(3;10)(?;?), der(11)t(11;12)(?;?), der(12;22)(?10;?10), t(15;16)(p10;?10), der(19)t(10;19)(?;p?)
4	47,XX	X, demi7	1, 2, 2, 3, 3, 5, 6, 6, 8, 9, 10, 10, 11, 12, 15, 16, 19	der(1;5)(?10;q10), del(2)(q?), der(2;3)(6?→6?::1?10→1?::2?→2?),

				<p>der(2)(6?→6?:2?→2?:3?→3q), der(3)t(3;9)(?;?), der(2)(19?→19?:2?→2?:9?→9?), ins (3;9)(p?), der(2)t(2;19)(?;?) t(8;11)(p10;p10), der(5;1)(5p→5?:1?→1?:2?→2?), der(6)(6p→6q?:2?→2?:1?→1?), .der(10)t(3;10)(?;?), der(11)t(11;12)(?;?), der(19)t(10;19)(?;p?), der(12;22)(?10;?10), t(15;16)(p10?;?10)</p>
5	46,XX	X, Demi 7	1, 2, 2, 3, 3, 5, 6, 6, 8, 9, 10, 10, 11, 12, 15, 16, 19	<p>der(1;5)(?10;q10), del(2)(q?), der(2)(6?→6?:2?→2?:3?→3q), der(2)t(2;19)(?;?), der(3)t(3;9)(?;?), ins(3;9)(3pter→3q?:9? →9?:3q?→3qter), der(5;1)(5p→5?:1?→1?:2?→2?), der(6)(6p→6q?:2?→2?:1?→1?), t(8;11)(p10;p10), der(9;19)(?10;?10), der(10)t(3;10)(?;?), der(11)t(11;12)(?;?), der(12;22)(?10;?10), der(19)t(10;19)(?;p?)</p>
6	46,XX	X, 7	1, 2, 2, 3, 3, 5, 6, 6, 8, 9, 10, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19	<p>der(1;5)(?10;q10), der(1;19)(?10;?10), der(2;5)(?10;?10) der(2)(6?→6?:2?→2?:3?→3q), der(2;19)(?10;?10), der(3)t(3;9)(?;?), der(6)(6p→6q?:2?→2?:1?→1?), , t(8;11)(?10;?10), der(9;19)(?10;?10), der(10)t(3;10)(?;?), der(11)t(11;12)(?;?), der(12;14)(?10;?10), t(15;16)(?10;?10)</p>
7	46,XX	7	1, 2, 2, 3, 3, 5, 6, 6, 8, 9, 10, 10, 11, 12, 15, 16, 19	<p>der(1;5)(?10;q10), der(2)(6?→6?:2?→2?:3?→3q), der(2;19)(?10;?10), der(3)t(3;9)(?;?), ins(3;9)(3pter→3q?:9? →9?:3q?→3qter), der(5;1)(5p→5?:1?→1?:2?→2?), der(6)(6p→6q?:2?→2?:1?→1?), t(8;11)(p10;p10) der(9;19)(?10;?10) der(10)t(3;10)(?;?), der(10;19)(?10;?10) der(11)t(11;12)(?;?), der(12;22)(?10;?10); der(15;16)(?10;?10)</p>
8	47,XXX	7, X	1, 2, 2, 3, 3, 5, 6, 6, 8, 9, 10, 10, 11, 12, 15, 16, 19	<p>der(3;9)(?10;?10), der(3;16)(?10;?10), der(6;1)(6p→6?:1?→1?:2?→2?), der(8;19)(?10;?10), der(8;11)(?10;?10), der(11)t(11;12)(?;?), t(15;16)(?10;?10), der(15;16)(?10;?10)</p>
9	47,XXX	7, X	1, 2, 2, 3, 3, 5, 6, 6, 8, 9, 10, 10, 11, 12, 15, 16, 19	<p>der(1;19)(?10;?10), der(2;19)(?10;?10)x2, t (1;5)(?10;?10), der(10)t(3;10)(?;?), der(15;16)(?10;?10) der(1;5)(?10;?10), der(1;5)(5p→5?:1?→1?:2?→2?),</p>
10	47, XX	7	1, 2, 2, 3, 3, 5, 6, 6, 9, 10, 10, 11, 12, 15, 16, 19	<p>der(1;6)(6p→6?:1?→1?:2?→2?),</p>

der(2)(10?→10?:2?→2?:9?→9?), der(2;19)(?10;?10),
 der(3;6)(?10;?10), der(3,9)(?10;p10), der(6;10)(?10;?10)
 der(8;18)(?10;?10), der(10;19)(?10;?10), der(11;17)(?10;?10),
 t(15;16)(?10;?10)

Spécimen 7

#cellule	# chromosome	Chromosomes surnuméraires	Délétions	Dérivés
1	63,XXY	1, 3	2, 9, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 19, 21	der(9)t(9;15)(q?p?), der(?) (?;17)(?;?)
2	64,XXYY	1, 8, 21	2, 9, 10, 13, 14, 15, 17, 16, 19, 22	der(9)t(9;15)(q?p?), der(?) (?;17)(?;?)
3	64,XXYY	1, 7, 8	6, 9, 13, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 22	der(9)t(9;15)(q?p?), der(?) (?;17)(?;?)
4	65,XXY	1, 7, 8	6, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 22	der(9)t(9;15)(q?p?), der(?) (?;17)(?;?)
5	72,XXYY	4, 6, 7, 7, 7, 15, 18, 18, 19	8, 13, 14, 16, 16, 20, 20, 21	der(9)t(9;15)(q?p?), der(?) (?;17)(?;?)
6	68,XXYY	1, 7, 8, 21	6, 9, 10, 13, 14, 15, 17, 18, 22	der(9)t(9;15)(q?p?), der(?) (?;17)(?;?)
7	59,XXY	1	2, 5, 5, 6, 7, 9, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 19, 22, 22, X	der(9)t(9;15)(q?p?), der(?) (?;17)(?;?), del(7)(p?→pter), del(7)(q?→qter)
8	62,XXY	3, 16	2, 6, 8, 99, 10, 11, 13, 13, 14, 15, 17, 22	der(9)t(9;15)(q?p?), der(?) (?;17)(?;?)

Spécimen 8

#cellule	# chromosome	Chromosomes surnuméraires	Délétions	Dérivés
1	36	8, 18	X, X, 2, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 17, 19, 21, 22	
2	44,XY	X	2, 2, 4, 4, 5, 5, 9, 11, 12, 13, 13, 14, 14, 15, 17, 18, 18, 19, 19, 20, 20, 21, 21, 22, 22	der(13; 19)(?10;?10), der(6; 16) (?10;?10)
3	28	18	X,X, 1, 1, 2, 2, 3, 4, 4, 5, 6, 7, 7, 11, 11, 13, 14, 14, 17, 21,	t(1;12)(p10;?10)

			22, 22	
4	115,XXX	1, 7, 7, 7, 8, 8, 8, 16, 16, 16, 19, 20	2, 2, 4, 5, x, x, 6, 9, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 21, 21, 21, 22	der(1)t(1;9)(p?;?), der(12;21)(?10;?10), t(x/10?)(?;?), der(6;2/7?)(?10;?10)
5	62,XXX	X, 1, 3, 7, 7, 8, 8, 8, 20	X, Y, 6, 10, 11, 13, 13, 13, 14, 15, 15, 16, 16, 18, 19, 21, 21, 21	der(1)t(1;9)(p?;?) x2
6	44,X	5, 6, 7, 7, 8, 16, 18, 19, 20,	1, 2, 4, 11, 12, 13, 14, 22	der(12;21)(?10;?10), der(X;21)(?10;?10)
7	122,XXXX	7x5,8, 8, 14, 16, 19, 19, 20,22	2, 4, 5, 6, 6, 6, 9, 11, 12, 13, 13, 13, 15, 15, 17, 18, 21	der(1)t(1;9)(p?;?)x2, der(3;13)(?10;?10), der(5;6)(?10;?10), der(6;2/7?)(?10;?10)der(9;11)(?10;?10)x2, der(12;21)(?10;?10), der(13;15)(?10;?10), der(X;21)(?10;?10)
8	113,XXXXY	7x3, 8, 8, 14,	2, 2, 4, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 21	der(1)t(1;9)(p?;?)x2, der(6;7)(?10;?10), der(9;11)(?10;?10)x2, der(12;21)(?10;?10), der(16,5/6?)(?10;?10), der(X;21)(?10;?10),
9	84, XXY	X, 3, 3, 7, 7, 8, 9, 12, 16, 16, 20, 20	2, 13	der(1)t(1;9)(p?;?), der(12;21)(?10;?10)
10	117, XXXX	3, 5, 7x4, 8, 14, 19, 2	2, 4, 6, 6, 6, 11, 11, 12, 13, 13, 15, 15, 17, 18, 18, 21, 21	der(1)t(1;9)(p?;?), der(6;7)(?10;?10), der(12;21)(?10;?10), der(X;21)(?10;?10),+mar(6)

Spécimen 9

# cellule	# chromosome	Chromosomes surnuméraires	Délétions	Dérivés
1	44,XY		3, 12, 15, 20, 22	
2	33		2, 7x2, 8, 9, 13, 15, 17, 19, 20, 22	
3	45,XY		21	
4	45,X		Y	
5	47,XY	11		
6	46,XY			
7	45,X		Y	

Spécimen 10

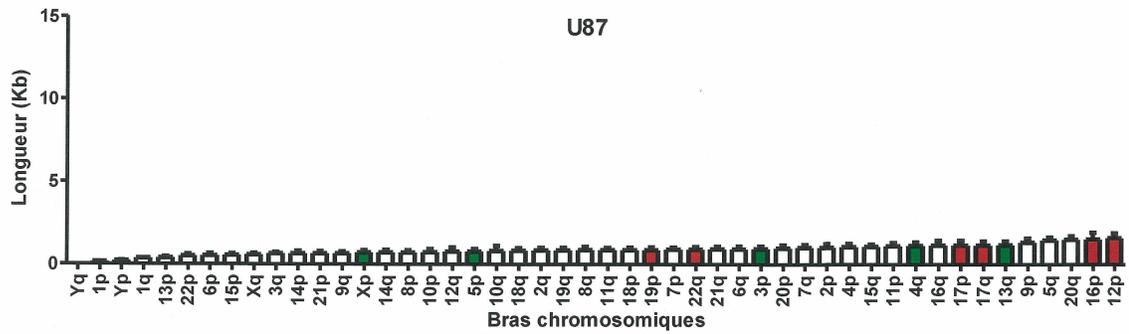
# cellule	# chromosome	Chromosomes surnuméraires	Délétions	Dérivés
1	46,XX			
2	46,XX			
3	46,XX			
4	46,XX			
5	46,XX			del(9)(p?)
6	46,XX			
7	45,XX		13	
8	44,XX		19, 21	
9	46,XX			
10	43,XX		2, 17, 21	

Spécimen 11

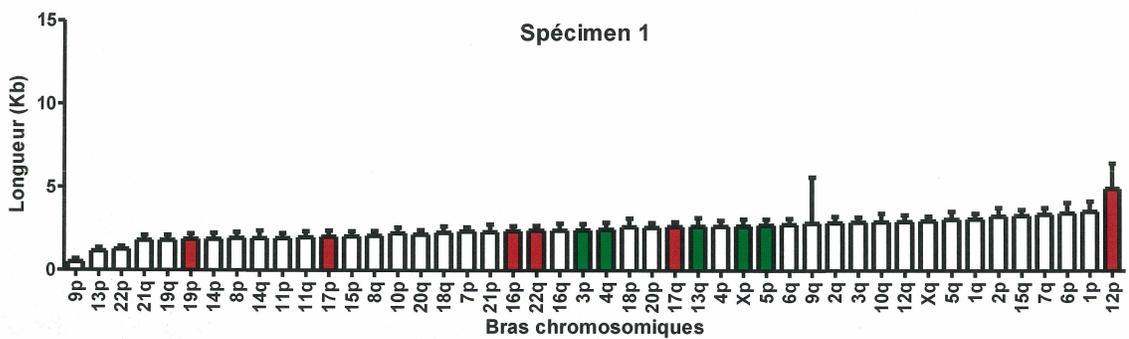
# cellule	# chromosome	Chromosomes surnuméraires	Délétions	Dérivés
1	43,XY		8	
2	92,XXYY			
3	47,XY	4p		
4	39,X		11, 11, 15, 16, 22	
5	43,XY		18, 19, 22	
6	45,X		Y	
7	43,X		9,10, Y	
8	44,XY		29	
9	93,XXYY			r(2)(p?,q?)

6.4 Annexe 4. Longueur individuelle des télomères pour les spécimens analysés, en comparaison avec les télomères constitutivement courts (rouge) et longs (verts) établis par Samassekou et coll.

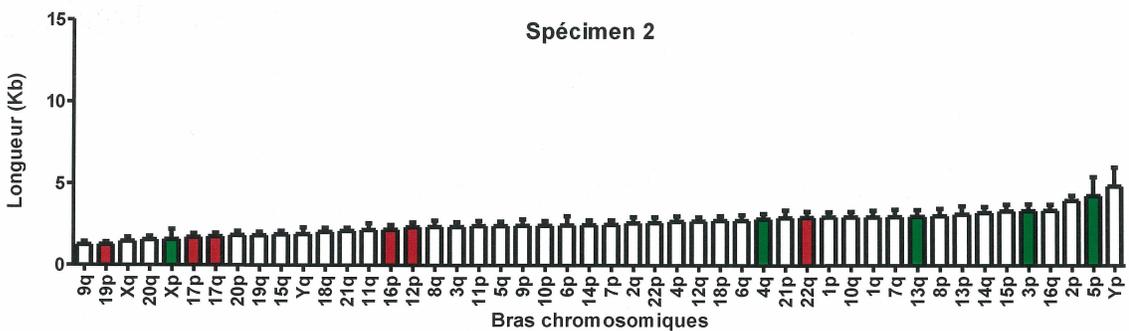
A)



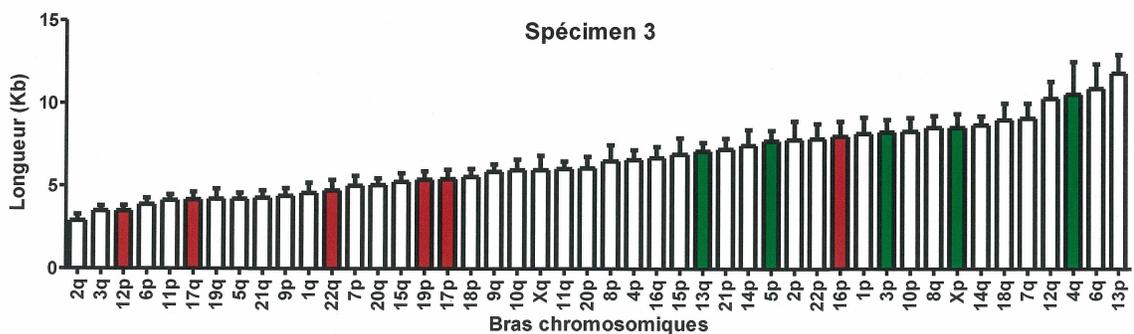
B)



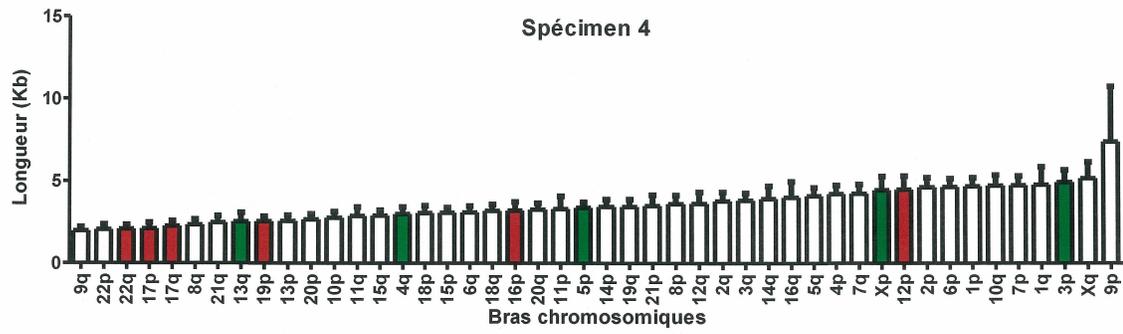
C)



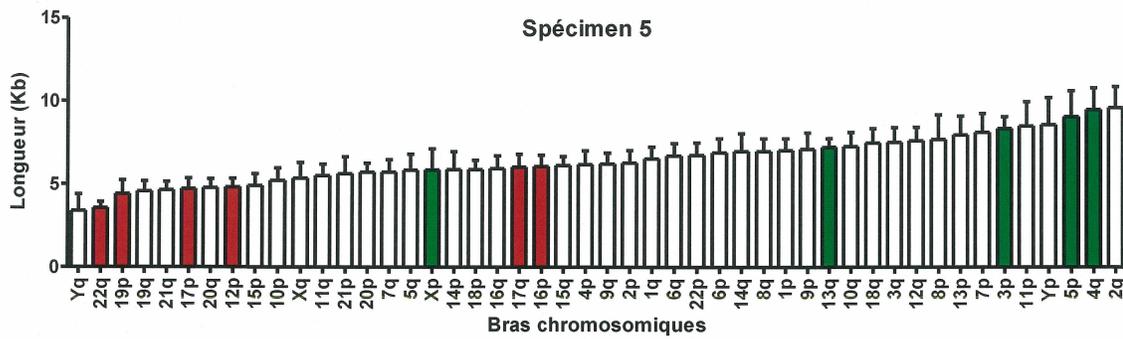
D)



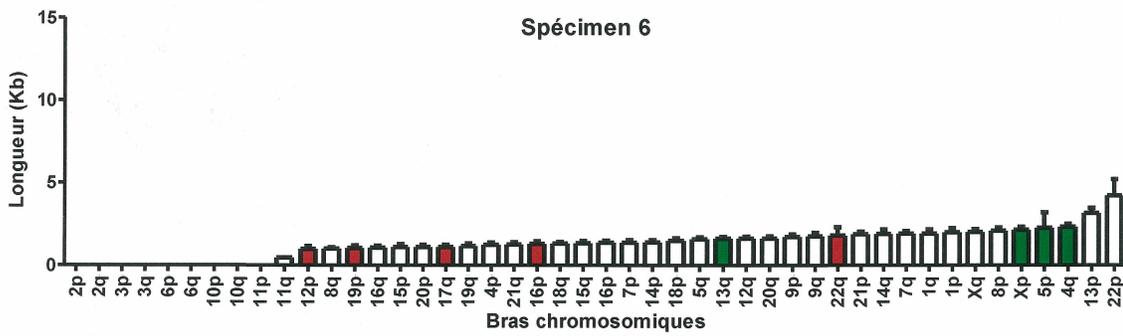
E)



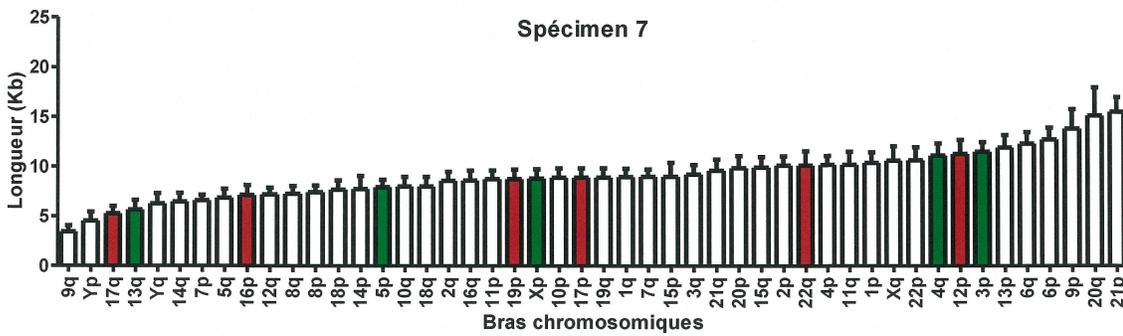
F)



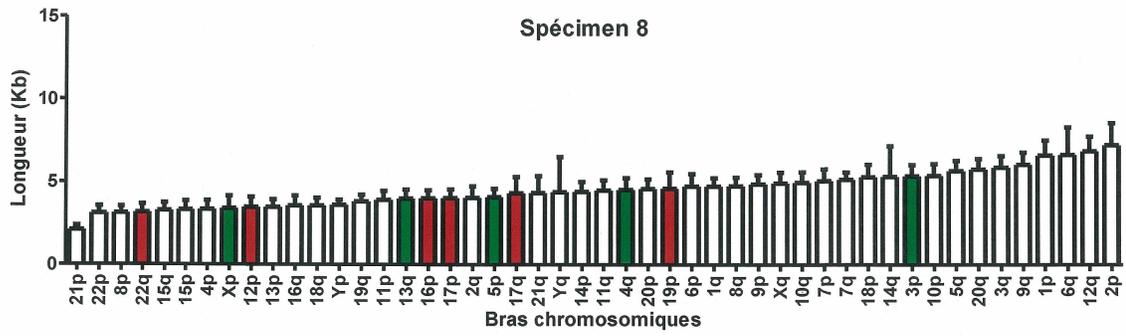
G)



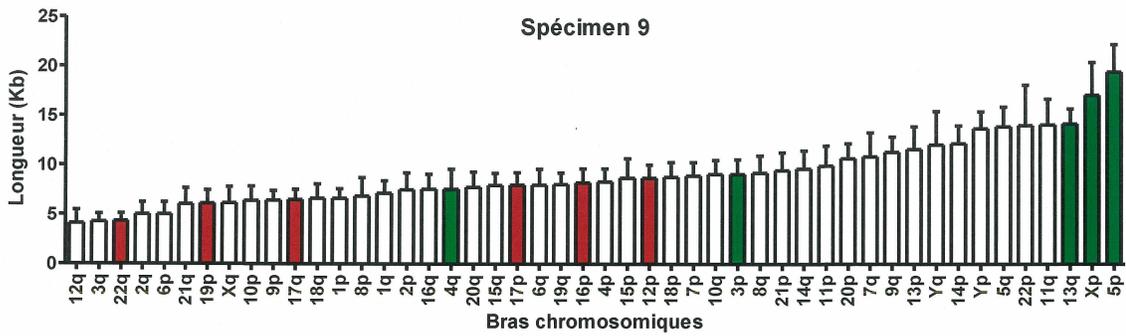
H)



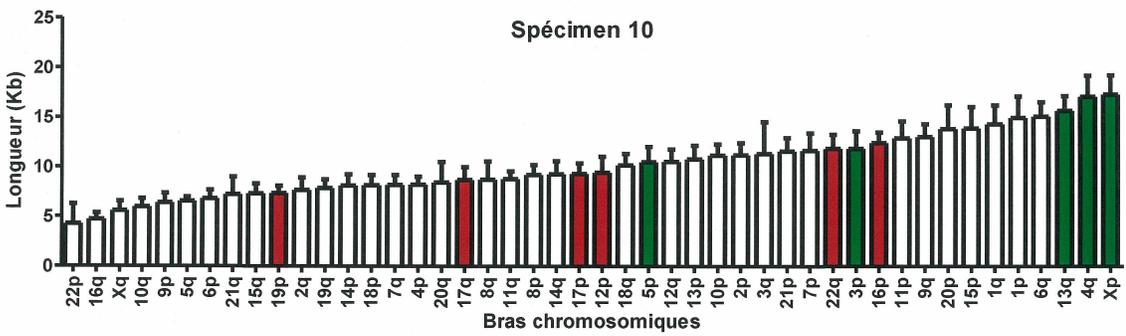
D)



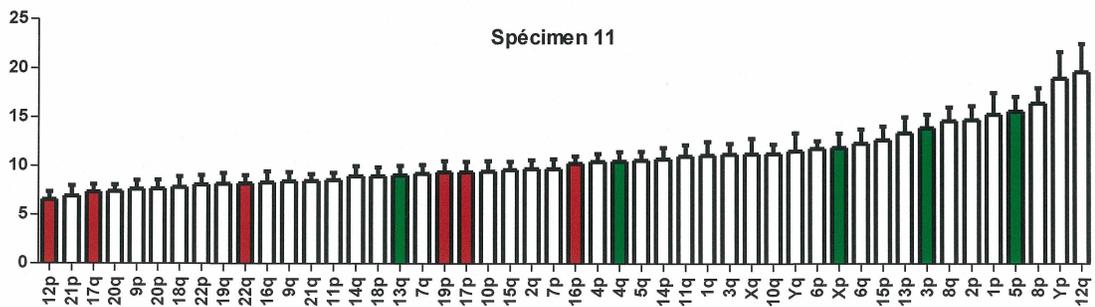
J)



K)



L)



LISTE DE RÉFÉRENCES

- Allsopp RC (1996) Models of initiation of replicative senescence by loss of telomeric DNA. *Exp Gerontol* 31:235-243.
- Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Azham M, Rogaev EI, Piatyszek MA, Shay JW, Harley CB (1995) Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 220:194-200.
- Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10114-10118.
- Arslantas A, Artan S, Oner U, Muslumanoglu MH, Ozdemir M, Durmaz R, Arslantas D, Vural M, Cosan E, Atasoy MA (2007) Genomic alterations in low-grade, anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Pathol Oncol Res* 13:39-46.
- ATCC® (2012) U-87 MG (ATCC® HTB-14™). <http://www.atcc.org/Products/All/HTB-14.aspx>. Accessed 01/24 2013.
- Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S (2009) Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 513:532-541.
- Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D (2003) Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat Genet* 33:203-207.
- Bilir A, Erguven M, Oktem G, Ozdemir A, Uslu A, Aktas E, Bonavida B (2008) Potentiation of cytotoxicity by combination of imatinib and chlorimipramine in glioma. *Int J Oncol* 32:829-839.
- Blackburn EH (1991) Structure and function of telomeres. *Nature* 350:569-573.
- Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S (2012) Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J Neurooncol* 108:11-27.
- Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR (1995) Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* 14:4240-4248.
- Bu Y, Cao D (2012) The origin of cancer stem cells. *Front Biosci (Schol Ed)* 4:819-830.
- Burger PC, Shibata T, Kleihues P (1986) The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: application to surgical neuropathology. *Am J Surg Pathol* 10:611-617.

Caporali A, Wark L, Vermolen BJ, Garini Y, Mai S (2007) Telomeric aggregates and end-to-end chromosomal fusions require myc box II. *Oncogene* 26:1398-1406.

Cesare AJ, Reddel RR (2010) Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet* 11:319-330.

Chen YJ, Hakin-Smith V, Teo M, Xinarianos GE, Jellinek DA, Carroll T, McDowell D, MacFarlane MR, Boet R, Baguley BC, Braithwaite AW, Reddel RR, Royds JA (2006) Association of mutant TP53 with alternative lengthening of telomeres and favorable prognosis in glioma. *Cancer Res* 66:6473-6476.

Chiang YJ, Calado RT, Hathcock KS, Lansdorp PM, Young NS, Hodes RJ (2010) Telomere length is inherited with resetting of the telomere set-point. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:10148-10153.

Clark MJ, Homer N, O'Connor BD, Chen Z, Eskin A, Lee H, Merriman B, Nelson SF (2010) U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genet* 6:e1000832.

Coe BP, Ylstra B, Carvalho B, Meijer GA, Macaulay C, Lam WL (2007) Resolving the resolution of array CGH. *Genomics* 89:647-653.

Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S (1992) Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 11:1921-1929.

Cremer T, Cremer M (2010) Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a003889.

Dahlback HS, Brandal P, Meling TR, Gorunova L, Scheie D, Heim S (2009) Genomic aberrations in 80 cases of primary glioblastoma multiforme: Pathogenetic heterogeneity and putative cytogenetic pathways. *Genes Chromosomes Cancer* 48:908-924.

der-Sarkissian H, Bacchetti S, Cazes L, Londono-Vallejo JA (2004) The shortest telomeres drive karyotype evolution in transformed cells. *Oncogene* 23:1221-1228.

Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C (2012) CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol* 14 Suppl 5:v1-49.

Du HY, Idol R, Robledo S, Ivanovich J, An P, Londono-Vallejo A, Wilson DB, Mason PJ, Bessler M (2007) Telomerase reverse transcriptase haploinsufficiency and telomere length in individuals with 5p- syndrome. *Aging Cell* 6:689-697.

Else T (2009) Telomeres and telomerase in adrenocortical tissue maintenance, carcinogenesis, and aging. *J Mol Endocrinol* 43:131-141.

- Fenton TR, Nathanson D, Ponte de Albuquerque C, Kuga D, Iwanami A, Dang J, Yang H, Tanaka K, Oba-Shinjo SM, Uno M, Inda MM, Wykosky J, Bachoo RM, James CD, DePinho RA, Vandenberg SR, Zhou H, Marie SK, Mischel PS, Cavenee WK, Furnari FB (2012) Resistance to EGF receptor inhibitors in glioblastoma mediated by phosphorylation of the PTEN tumor suppressor at tyrosine 240. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:14164-14169.
- Fisher BJ, Naumova E, Leighton CC, Naumov GN, Kerklviet N, Fortin D, Macdonald DR, Cairncross JG, Bauman GS, Stitt L (2002) Ki-67: a prognostic factor for low-grade glioma?. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52:996-1001.
- Fontebasso AM, Schwartzentruber J, Khuong-Quang DA, Liu XY, Sturm D, Korshunov A, Jones DT, Witt H, Kool M, Albrecht S, Fleming A, Hadjadj D, Busche S, Lepage P, Montpetit A, Staffa A, Gerges N, Zakrzewska M, Zakrzewski K, Liberski PP, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bogner L, Zadeh G, Faury D, Pfister SM, Jabado N, Majewski J (2013) Mutations in SETD2 and genes affecting histone H3K36 methylation target hemispheric high-grade gliomas. *Acta Neuropathol* 125:659-669.
- Fritz Aea (2008) Classification internationale des maladies pour l'oncologie. Bibliothèque de l'OMS 3e éd.
- Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2000) Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* 80:65-72.
- Gadji M, Fortin D, Tsanaclis AM, Garini Y, Katzir N, Wienburg Y, Yan J, Klewes L, Klonisch T, Drouin R, Mai S (2010) Three-dimensional nuclear telomere architecture is associated with differential time to progression and overall survival in glioblastoma patients. *Neoplasia* 12:183-191.
- Gadji M, Fortin D, Tsanaclis A, Drouin R (2009a) Is the 1p/19q deletion a diagnostic marker of oligodendrogliomas?. *Cancer Genet Cytogenet* 194:12-22.
- Gadji M, Tsanaclis Crous A, Fortin D, Krcek J, Torchia M, Mai S, Drouin R, Klonisch T (2009b) EGF receptor inhibitors in the treatment of glioblastoma multiform: Old clinical allies and newly emerging therapeutic concepts. *Eur J Pharmacol* 625:23-30.
- Gilson E, Londono-Vallejo A (2007) Telomere length profiles in humans: all ends are not equal. *Cell Cycle* 6:2486-2494.
- Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, Alonso DF (2012) Telomere structure and telomerase in health and disease (review). *Int J Oncol* 41:1561-1569.
- Graakjaer J, Londono-Vallejo JA, Christensen K, Kolvraa S (2006) The pattern of chromosome-specific variations in telomere length in humans shows signs of heritability and is maintained through life. *Ann N Y Acad Sci* 1067:311-316.

Graakjaer J, Pascoe L, Der-Sarkissian H, Thomas G, Kolvraa S, Christensen K, Londono-Vallejo JA (2004) The relative lengths of individual telomeres are defined in the zygote and strictly maintained during life. *Aging Cell* 3:97-102.

Hakin-Smith V, Jellinek DA, Levy D, Carroll T, Teo M, Timperley WR, McKay MJ, Reddel RR, Royds JA (2003) Alternative lengthening of telomeres and survival in patients with glioblastoma multiforme. *Lancet* 361:836-838.

Hassler M, Seidl S, Fazeny-Doerner B, Preusser M, Hainfellner J, Rossler K, Prayer D, Marosi C (2006) Diversity of cytogenetic and pathohistologic profiles in glioblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 166:46-55.

Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621.

Henson JD, Hannay JA, McCarthy SW, Royds JA, Yeager TR, Robinson RA, Wharton SB, Jellinek DA, Arbuckle SM, Yoo J, Robinson BG, Learoyd DL, Stalley PD, Bonar SF, Yu D, Pollock RE, Reddel RR (2005) A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative lengthening of telomeres in sarcomas and astrocytomas. *Clin Cancer Res* 11:217-225.

Hiraga S, Ohnishi T, Izumoto S, Miyahara E, Kanemura Y, Matsumura H, Arita N (1998) Telomerase activity and alterations in telomere length in human brain tumors. *Cancer Res* 58:2117-2125.

Horbinski C (2013) What do we know about IDH1/2 mutations so far, and how do we use it?. *Acta Neuropathol* 125:621-636.

Ishii A, Nakamura K, Kishimoto H, Honma N, Aida J, Sawabe M, Arai T, Fujiwara M, Takeuchi F, Kato M, Oshimura M, Izumiyama N, Takubo K (2006) Telomere shortening with aging in the human pancreas. *Exp Gerontol* 41:882-886.

Jackson C, Ruzevick J, Brem H, Lim M (2013) Vaccine strategies for glioblastoma: progress and future directions. *Immunotherapy* 5:155-167.

Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF, Rodriguez FJ, Rosenberg S, Oba-Shinjo SM, Nagahashi Marie SK, Bettegowda C, Agrawal N, Lipp E, Pirozzi C, Lopez G, He Y, Friedman H, Friedman AH, Riggins GJ, Holdhoff M, Burger P, McLendon R, Bigner DD, Vogelstein B, Meeker AK, Kinzler KW, Papadopoulos N, Diaz LA, Yan H (2012) Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* 3:709-722.

Jin Q, Zhang W, Qiu XG, Yan W, You G, Liu YW, Jiang T, Wang L (2011) Gene expression profiling reveals Ki-67 associated proliferation signature in human glioblastoma. *Chin Med J (Engl)* 124:2584-2588.

Joksic I, Vujic D, Guc-Scekic M, Leskovac A, Petrovic S, Ojani M, Trujillo JP, Surralles J, Zivkovic M, Stankovic A, Slijepcevic P, Joksic G (2012) Dysfunctional telomeres in primary cells from Fanconi anemia FANCD2 patients. *Genome Integr* 3:6-9414-3-6.

Kappei D, Londono-Vallejo JA (2008) Telomere length inheritance and aging. *Mech Ageing Dev* 129:17-26.

Kast RE, Focosi D (2010) Three paths to better tyrosine kinase inhibition behind the blood-brain barrier in treating chronic myelogenous leukemia and glioblastoma with imatinib. *Transl Oncol* 3:13-15.

Kheirollahi M, Mehrazin M, Kamalian N, Mehdipour P (2011) Alterations of telomere length in human brain tumors. *Med Oncol* 28:864-870.

Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, Liu XY, Fontebasso AM, Bouffet E, Bartels U, Albrecht S, Schwartzentruber J, Letourneau L, Bourgey M, Bourque G, Montpetit A, Bourret G, Lepage P, Fleming A, Lichter P, Kool M, von Deimling A, Sturm D, Korshunov A, Faury D, Jones DT, Majewski J, Pfister SM, Jabado N, Hawkins C (2012) K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol* 124:439-447.

Kilic T, Alberta JA, Zdunek PR, Acar M, Iannarelli P, O'Reilly T, Buchdunger E, Black PM, Stiles CD (2000) Intracranial inhibition of platelet-derived growth factor-mediated glioblastoma cell growth by an orally active kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Cancer Res* 60:5143-5150.

Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, Jr, Friedman AH, Friedman H, Gallia GL, Giovanella BC, Grollman AP, He TC, He Y, Hruban RH, Jallo GI, Mandahl N, Meeker AK, Mertens F, Netto GJ, Rasheed BA, Riggins GJ, Rosenquist TA, Schiffman M, Shih I, Theodorescu D, Torbenson MS, Velculescu VE, Wang TL, Wentzensen N, Wood LD, Zhang M, McLendon RE, Bigner DD, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Yan H (2013) TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:6021-6026.

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

Kowalska A, Bozsaky E, Ambros PF (2010) Sequence-based high resolution chromosomal comparative genomic hybridization (CGH). *Methods Mol Biol* 659:299-312.

Kramar F, Zemanova Z, Michalova K, Babicka L, Ransdorfova S, Hrabal P, Kozler P (2007) Cytogenetic analyses in 81 patients with brain gliomas: correlation with clinical outcome and morphological data. *J Neurooncol* 84:201-211.

Kros JM, van Run PR, Alers JC, Avezaat CJ, Luider TM, van Dekken H (2001) Spatial variability of genomic aberrations in a large glioblastoma resection specimen. *Acta Neuropathol* 102:103-109.

Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, Raap AK, Tanke HJ (1996) Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 5:685-691.

Les éditions Québec Amérique Inc. (2010) *Encyclopédie familiale de la santé: Comprendre, prévenir, soigner*:608.

Leu S, von Felten S, Frank S, Vassella E, Vajtai I, Taylor E, Schulz M, Hutter G, Hench J, Schucht P, Boulay JL, Mariani L (2013) IDH/MGMT-driven molecular classification of low-grade glioma is a strong predictor for long-term survival. *Neuro Oncol*.

Liu XY, Gerges N, Korshunov A, Sabha N, Khuong-Quang DA, Fontebasso AM, Fleming A, Hadjadj D, Schwartzentruber J, Majewski J, Dong Z, Siegel P, Albrecht S, Croul S, Jones DT, Kool M, Tonjes M, Reifenberger G, Faury D, Zadeh G, Pfister S, Jabado N (2012) Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol* 124:615-625.

Londono-Vallejo JA (2009) Un Nobel centenaire célèbre télomères et télomérase. *Med Sci (Paris)* 25:973-976.

Londono-Vallejo JA (2008) Telomere instability and cancer. *Biochimie* 90:73-82.

Londono-Vallejo JA, DerSarkissian H, Cazes L, Thomas G (2001) Differences in telomere length between homologous chromosomes in humans. *Nucleic Acids Res* 29:3164-3171.

Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee W, Burger P, Jouvet A, Scheithauer B, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97-206.

Maes L, Van Neste L, Van Damme K, Kalala JP, De Ridder L, Bekaert S, Cornelissen M (2007) Relation between telomerase activity, hTERT and telomere length for intracranial tumours. *Oncol Rep* 18:1571-1576.

Marieb EN (1999) *Anatomie et physiologie humaines* 2e éd. ERPI, Saint-Laurent, Qc.

Martin SG, Laroche T, Suka N, Grunstein M, Gasser SM (1999) Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. *Cell* 97:621-633.

Marumoto T, Saya H (2012) Molecular biology of glioma. *Adv Exp Med Biol* 746:2-11.

McDonald KL, McDonnell J, Muntoni A, Henson JD, Hegi ME, von Deimling A, Wheeler HR, Cook RJ, Biggs MT, Little NS, Robinson BG, Reddel RR, Royds JA (2010) Presence of alternative lengthening of telomeres mechanism in patients with glioblastoma identifies a less aggressive tumor type with longer survival. *J Neuropathol Exp Neurol* 69:729-736.

Mocellin S, Pooley KA, Nitti D (2013) Telomerase and the search for the end of cancer. *Trends Mol Med* 19:125-133.

- Nakamura K, Takubo K, Izumiyama-Shimomura N, Sawabe M, Arai T, Kishimoto H, Fujiwara M, Kato M, Oshimura M, Ishii A, Ishikawa N (2007) Telomeric DNA length in cerebral gray and white matter is associated with longevity in individuals aged 70 years or older. *Exp Gerontol* 42:944-950.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26:523-530.
- Nicholas MK, Lukas RV, Chmura S, Yamini B, Lesniak M, Pytel P (2011) Molecular heterogeneity in glioblastoma: therapeutic opportunities and challenges. *Semin Oncol* 38:243-253.
- Novo CL, Londono-Vallejo JA (2012) Telomeres and the nucleus. *Semin Cancer Biol* 23:116-124.
- Ohali A, Avigad S, Ash S, Goshen Y, Luria D, Feinmesser M, Zaizov R, Yaniv I (2006) Telomere length is a prognostic factor in neuroblastoma. *Cancer* 107:1391-1399.
- Ohgaki H, Kleihues P (2013) The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19:764-772.
- Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170:1445-1453.
- Ohyashiki JH, Sashida G, Tauchi T, Ohyashiki K (2002) Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia. *Oncogene* 21:680-687.
- Paques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:349-404.
- Pellestor F, Paulasova P, Macek M, Hamamah S (2005) The peptide nucleic acids (PNAs): "high-tech" probes for genetic and molecular cytogenetic investigations. *Med Sci (Paris)* 21:753-758.
- Qu HQ, Jacob K, Fatet S, Ge B, Barnett D, Delattre O, Faury D, Montpetit A, Solomon L, Hauser P, Garami M, Bogner L, Hansely Z, Mio R, Farmer JP, Albrecht S, Polychronakos C, Hawkins C, Jabado N (2010) Genome-wide profiling using single-nucleotide polymorphism arrays identifies novel chromosomal imbalances in pediatric glioblastomas. *Neuro Oncol* 12:153-163.
- Reddy S, Li B, Comai L (2010) Processing of human telomeres by the Werner syndrome protein. *Cell Cycle* 9:3137-3138.
- Royds JA, Al Nadaf S, Wiles AK, Chen YJ, Ahn A, Shaw A, Bowie S, Lam F, Baguley BC, Braithwaite AW, MacFarlane MR, Hung NA, Slatter TL (2011) The CDKN2A G500 allele is more frequent in GBM patients with no defined telomere maintenance mechanism tumors and is associated with poorer survival. *PLoS One* 6:e26737.

- Salvo MD, Maresca G, Igea D'agnano, Marchese R, Stigliano A, Gagliassi R, Brunetti E, Raza GH, Paula UD, Bucci B (2011) Temozolomide induced c-Myc-mediated apoptosis via Akt signalling in MGMT expressing glioblastoma cells. *Int J Radiat Biol* 87:518-533.
- Samassekou O, Li H, Hebert J, Ntwari A, Wang H, Cliche CG, Bouchard E, Huang S, Yan J (2011) Chromosome arm-specific long telomeres: a new clonal event in primary chronic myelogenous leukemia cells. *Neoplasia* 13:550-560.
- Samassekou O, Gadji M, Drouin R, Yan J (2010) Sizing the ends: normal length of human telomeres. *Ann Anat* 192:284-291.
- Samassekou O, Ntwari A, Hebert J, Yan J (2009) Individual telomere lengths in chronic myeloid leukemia. *Neoplasia* 11:1146-1154.
- Samassekou O, Université de Sherbrooke (2011) Dynamique des changements de la longueur des télomères individuels et de leur architecture nucléaire dans les cellules néoplasiques. S.l.
- Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre JY (2009) Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol* 27:4150-4154.
- Schroder R, Feisel KD, Ernestus RI (2002) Ki-67 labeling is correlated with the time to recurrence in primary glioblastomas. *J Neurooncol* 56:127-132.
- Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Fontebasso AM, Quang DA, Tonjes M, Hovestadt V, Albrecht S, Kool M, Nantel A, Konermann C, Lindroth A, Jager N, Rausch T, Ryzhova M, Korbel JO, Hielscher T, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bogner L, Ebinger M, Schuhmann MU, Scheurlen W, Pekrun A, Fruhwald MC, Roggendorf W, Kramm C, Durken M, Atkinson J, Lepage P, Montpetit A, Zakrzewska M, Zakrzewski K, Liberski PP, Dong Z, Siegel P, Kulozik AE, Zapatka M, Guha A, Malkin D, Felsberg J, Reifenberger G, von Deimling A, Ichimura K, Collins VP, Witt H, Milde T, Witt O, Zhang C, Castelo-Branco P, Lichter P, Faury D, Tabori U, Plass C, Majewski J, Pfister SM, Jabado N (2012) Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 482:226-231.
- Sfeir A, de Lange T (2012) Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. *Science* 336:593-597.
- Shaffer LG, Tommerup N (2005) ISCN (2005): An International System for Human Nomenclature. S.Karger, Basel.
- Shay JW, Wright WE (2005) Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* 26:867-874.
- Shay JW, Wright WE (2004) Telomeres in dyskeratosis congenita. *Nat Genet* 36:437-438.

Slijepcevic P (2001) Telomere length measurement by Q-FISH. *Methods Cell Sci* 23:17-22.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987-996.

Takubo K, Izumiyama-Shimomura N, Honma N, Sawabe M, Arai T, Kato M, Oshimura M, Nakamura K (2002) Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Exp Gerontol* 37:523-531.

Vera E, Blasco MA (2012) Beyond average: potential for measurement of short telomeres. *Aging (Albany NY)* 4:379-392.

Verdaasdonk JS, Bloom K (2011) Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:320-332.

Verdun RE, Karlseder J (2007) Replication and protection of telomeres. *Nature* 447:924-931.

Vermolen BJ, Garini Y, Mai S, Mougey V, Fest T, Chuang TC-, Chuang AY-, Wark L, Young IT (2005) Characterizing the three-dimensional organization of telomeres 67A.

Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, Kajigaya S, Baerlocher GM, Chanock SJ, Lansdorp PM, Young NS (2005) Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N Engl J Med* 352:1413-1424.

Yan H, Bigner DD, Velculescu V, Parsons DW (2009) Mutant metabolic enzymes are at the origin of gliomas. *Cancer Res* 69:9157-9159.

Zuber MA, Koschny R, Koschny T, Froster UG (2002a) Gain of chromosome 7 detected by comparative genomic hybridization accumulates with age in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Genet Cytogenet* 136:92-94.

Zuber MA, Krupp W, Holland H, Froster UG (2002b) Characterization of chromosomal aberrations in a case of glioblastoma multiforme combining cytogenetic and molecular cytogenetic techniques. *Cancer Genet Cytogenet* 138:111-115.